

REINIGUNG UND EIGENSCHAFTEN DER
FRUCTOSE-6-PHOSPHAT-KINASE

HANS WERNER HOFER

1968



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555415_0041

Aus dem Physiologisch - Chemischen Institut der
Universität München

Direktor: Professor Dr. Dr. h.c. Theodor Bücher

REINIGUNG UND EIGENSCHAFTEN DER
FRUCTOSE-6-PHOSPHAT-KINASE

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München
vorgelegt von

HANS WERNER HOFER

aus

München

1968

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München:

Referent: Prof. Dr. D. Pette

Correferent: Prof. Dr. Dr. Th. Bücher

Dekan: Prof. Dr. F. Holle

Tag der mündlichen Prüfung: 2. Juli 1968

In Dankbarkeit
meinen Eltern
gewidmet

Sonderdruck aus
Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie
Walter de Gruyter & Co., Berlin 30

HOPPE-SEYLER'S Z. PHYSIOL. CHEM.
Bd. 349, S. 995—1012, August 1968

Zusammenfassung:

1. Die Extrahierbarkeit der Phosphofructokinase (EC 2.7.1.11) aus Kaninchenskelettmuskel ist eine Funktion ihrer Lokalisation in der Muskelzelle. Dabei ergeben sich Hinweise dafür, daß ein Teil der gesamten zellulären Phosphofructokinase entweder an Strukturen bzw. Strukturproteine des Muskels gebunden ist, oder aber in schwer löslicher Aggregation vorliegt. Die systematische Untersuchung von chemischen und physikalischen Parametern der Extraktion ermöglicht die Angabe eines optimalen präparativen Extraktionsverfahrens.

2. Die Gültigkeit einer modifizierten COHNschen Beziehung für die Löslichkeit der Phosphofructokinase bei hohen Ionenstärken wird nachgewiesen. Die Enzymaktivität wird dabei als Maß für die Konzentration des Enzymproteins verwendet. Es werden Formeln abgeleitet, welche die Berechnung der präparativen Fällungsgrenzen in Abhängigkeit von einer frei wählbaren Ausbeute erlauben. Die zur Berechnung benötigten Konstanten wurden experimentell bestimmt.

3. Die Abhängigkeit der Phosphofructokinase-Löslichkeit bei hohen Ionenstärken von Salzart, pH und Temperatur wurde untersucht. Der gesetzmäßige Zusammenhang zwischen den Fällungskonstanten und der Temperatur wird dargelegt.

4. Die Beziehung zwischen Acetonkonzentration und der in acetonhaltigen Lösungen bei hohen Ionenstärken maximal löslichen Phosphofructokinase läßt sich quantitativ durch eine Exponentialgleichung angeben. Dies ermöglicht die Vorausberechnung der optimalen Fällungsgrenzen bei einer fraktionierten Fällung mit Aceton.

5. Die Abhängigkeit der Wärmestabilität der Phosphofructokinase von Inkubationsmedium, Temperatur und Zeit wurde untersucht. Quantitative Beziehungen, welche das Verhalten bei höheren Temperaturen beschreiben, wurden ermittelt. Die optimalen Bedingungen für die Anwendung einer Hitzebehandlung als Reinigungsschritt werden genannt.

6. Ein einfacher Präparationsgang, der zu der bislang höchsten spezif. Aktivität (240 U/mg Protein) führt, und die Kristallisation des Enzyms werden beschrieben.

Der DEUTSCHEN FORSCHUNGSGEMEINSCHAFT danken wir für die großzügige Unterstützung der Untersuchungen.

* Postanschrift: Prof. Dr. D. PETTE, D-7750 Konstanz, Postfach 733.

Enzyme:

Aldolase (Fructosediphosphat-Aldolase), Fructose-1,6-diphosphat-D-Glycerinaldehyd-3-phosphat-Lyase (EC 4.1.2.13)

Aspartat-Aminotransferase, L-Aspartat:2-Oxo-glutarat-Aminotransferase (EC 2.6.1.1)

Citrat-Synthase, Citrat-Oxalacetat-Lyase (CoA acylierend) (EC 4.1.3.7)

Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase, L-Glycerin-3-phosphat:NAD-Oxydoreduktase (EC 1.1.1.8)

Phosphofructokinase, ATP:D-Fructose-6-phosphat-1-Phosphotransferase (EC 2.7.1.11)

Phosphoglycerat-Kinase, ATP:3-Phospho-D-glycerat-1-Phosphotransferase (EC 2.7.2.3)

Triosephosphat-Isomerase, D-Glycerinaldehyd-3-phosphat-Ketol-Isomerase (EC 5.3.1.1)

Summary: *A method for the standardized extraction and purification of phosphofructokinase from rabbit skeletal muscle.*

1. The efficiency of extraction of phosphofructokinase (EC 2.7.1.11) from rabbit muscle is correlative to its localisation within the muscle cell. It is thus suggested that part of the total cellular phosphofructokinase is structurally bound, perhaps to the structural proteins of the muscle, or it exists as an aggregate of low solubility. The chemical and physical parameters of the extractions were studied, and the optimal conditions for preparative extraction are reported.

2. It was shown that a modified COHN relationship is valid for the solubility of phosphofructokinase at high ionic strength. Under these conditions the enzyme activity is used as a measure of the concentration of the enzyme protein. Formulae are derived for the relationship between the preparative precipitation limits and the chosen yield. The necessary constants for this calculation were determined experimentally.

3. The dependence of the solubility of phosphofructokinase on the type of salt, pH and temperature was investigated at high ionic strengths. The relationship between the precipitation constants and temperature was shown.

4. The relationship between acetone concentrations and the amount of phosphofructokinase maximally soluble at high ionic strengths in acetone-containing solutions can be expressed quantitatively by an exponential equation. In this way, a preliminary calculation can be made of the optimal precipitation limits for a fractional precipitation with acetone.

5. The dependence of the heat stability of phosphofructokinase on incubation medium, temperature and time was studied. The behaviour at high temperatures was put on a quantitative basis, and the optimal conditions for the use of heat treatment as a purification stage are given.

6. A simple preparative procedure is described, which results in the highest specific activity so far, and gives a crystalline enzyme.

Phosphofructokinase wurde 1965 gleichzeitig von PARMEGGIANI und KREBS¹ aus Kaninchenmuskel und von MANSOUR, WAKID und SPROUSE² aus Schafherz kristallisiert. Ein verbesserter Präparationsgang mit Kristallisation des Enzyms wurde 1967 von PAETKAU und LARDY³ mitgeteilt*. Der relativ späte Zeitpunkt der Kristallisation steht im umgekehrten Verhältnis zum Interesse, welches diesem Enzym entgegengebracht wurde. Ursache hierfür sind neben den kinetischen Besonderheiten der Phosphofructokinase Probleme, welche die Extraktion, die Stabilität, spezifische Reinigungsschritte und schließlich auch die Kristallisation des Enzyms betreffen.

In vorausgegangenen Mitteilungen haben wir von einem zusätzlichen Problem berichtet⁴⁻⁶. Aus

Skelettmuskulatur gelang die Präparation hochgereinigter Phosphofructokinase, die sich als mit einer Nucleinsäure assoziiert erwies. Da sich eine gewisse Abhängigkeit unserer Präparationen vom angewandten Reinigungsverfahren zu ergeben schien, unterzogen wir unsere Methode einer kritischen Analyse.

In der vorliegenden Arbeit berichten wir über systematische Studien zur Extraktion, Reinigung und Kristallisation der Phosphofructokinase. Es soll dabei aufgezeigt werden, daß die Extraktion und Reinigung eines Enzymproteins eine kalkulierbare Methode sein kann, welche die Vorausberechnung der Enzymausbeute und des Reinigungserfolges gestattet.

Methoden und Reagenzien

Die *Reagenzien* wurden von den Firmen Merck, Boehringer & Soehne GmbH. und Sigma Chemical Co. bezogen. Alle Lösungen wurden in bidestilliertem Wasser angesetzt und auf einen neutralen pH-Wert eingestellt.

Die Bestimmung der *Phosphofructokinase-Aktivität* erfolgte im zusammengesetzten optischen Test bei 366 m μ .

⁶ D. PETTE u. H. W. HOFER, in *Control of Energy Metabolism*, ed. by BR. CHANCE, R. W. ESTABROOK and J. R. WILLIAMSON, Academic Press, New York 1965.

* An dieser Stelle danken wir Herrn Prof. Dr. H. A. LARDY und Herrn Dr. V. PAETKAU für die Überlassung einer Probe ihrer kristallisierten Phosphofructokinase.

¹ A. PARMEGGIANI u. E. G. KREBS, *Biochem. biophysic. Res. Commun.* **19**, 89 [1965].

² T. E. MANSOUR, N. W. WAKID u. H. M. SPROUSE, *Biochem. biophysic. Res. Commun.* **19**, 721 [1965].

³ V. PAETKAU u. H. A. LARDY, *J. biol. Chemistry* **242**, 2035 [1967].

⁴ H. W. HOFER u. D. PETTE, *Life Sci.* **4**, 1591 [1965].

⁵ H. W. HOFER u. D. PETTE, *Z. klin. Chem.* **3**, 203 [1965].

und 25°C. Die Endkonzentrationen im Test waren: Triäthanolamin-hydrochlorid 50mM; Äthylendiamin-tetraacetat (EDTA) 5mM; MgSO₄ 8mM; Fructose-6-phosphat (Fru-6-P) 2mM; ATP 1mM; NADH 0,2mM; Aldolase 5 µg; Triosephosphat-Isomerase 1 µg; Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase 3 µg. Testvolumen 1 ml; pH 7,6. Die Aktivität der Phosphofructokinase wird in µMol Substratumsatz pro Min. (U) ausgedrückt.

Das Gesamtprotein wurde mit der von BEISENHERZ et al.⁷ modifizierten Biuretmethode bestimmt.

Die Ribonucleinsäure wurde mit Orcinreagens^{8,9} quantitativ bestimmt.

Die Phosphatbestimmung erfolgte nach SCHNITTGER et al.¹⁰.

Ammoniumsulfatbestimmung: a) acidimetrisch nach I. c.¹¹; b) refraktometrisch.

Eine orientierende Bestimmung der Ammoniumsulfatkonzentration kann nach unserer Erfahrung auch mit dem ABBE-Refraktometer (Zeiss) vorgenommen werden: 0,5 ml Probenlösung werden mit 0,075 ml 3M Trichloroessigsäure versetzt und der Niederschlag durch Zentrifugation abgetrennt. Vom Überstand werden ca. 0,1 ml in das Refraktometer gebracht und der Brechungsindex wird gegen einen Blindwert gemessen, der mit dem gleichen Extrakt vor der Ammoniumsulfatzugabe bestimmt wurde. Berechnung:

$$(n_{\text{Probe}} - n_{\text{Blind}} - 0,002) \times 65 = (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4\text{-Konzentration in Mol/l}$$

Der Korrekturfaktor von 0,002 und der Faktor 65 wurden experimentell mit Hilfe einer Eichgeraden bestimmt. Die Abweichungen vom KJELDAHL-Wert (acidimetrische Ammoniumsulfatbestimmung) waren in keinem Fall größer als 2%.

Präparation und Vorbereitung des Muskelmaterials

Ausgangsmaterial zur Gewinnung der Phosphofructokinase war die Skelettmuskulatur von 3 bis 5 Kilogramm schweren Kaninchen (Rasse: „Deutsche Widder“). Die Tiere wurden durch Genickschlag getötet und gründlich ausgeblutet.

Im Kühlraum (+3°C) wurde die Muskulatur der Extremitäten und des Rückens entnommen und sorgfältig von Fett und Bindegewebe befreit. Das Muskelmaterial wurde sofort in einem teflonisierten Haushaltsfleischwolf durch eine Lochscheibe mit Bohrungen von 2 mm

Durchmesser zerkleinert und im Extraktionspuffer aufgenommen.

Extraktion

Im Standardverfahren wurde der eingewogene Muskelbrei in gekühltem Extraktionspuffer im Verhältnis 1:10 (d. h. 1 kg Muskel + 9 l Puffer) aufgenommen. Der pH-Wert der Suspension wurde mit 15proz. NH₄OH auf einen Wert von 7,6 nachgestellt.

Die Suspension wurde bei +3°C 200 Min. gerührt und anschließend bei 2000 × g abzentrifugiert.

Ammoniumsulfatfraktionierung

a) Fraktionierung mit kristallinem Ammoniumsulfat

Volumina über 1000 ml wurden mit festem Ammoniumsulfat auf die gewünschten Molaritäten eingestellt, wobei die benötigte Menge nach I. c.⁷ berechnet und acidimetrisch bzw. refraktometrisch kontrolliert wurde.

Der pH-Wert wurde während der Fällung durch Zugabe von 25proz. NH₄OH konstant auf 7,6 gehalten. pH-Kontrolle und Ammoniakzugabe erfolgten automatisch durch das mit der 25-ml-Autobürette versehene pH-Stat Gerät der Fa. Radiometer. Unter Rühren wurden pro Std. 500 g festes Ammoniumsulfat mit dem Salzstreuer nach BÜCHER⁷ zugegeben. Nach beendeter Zugabe wurde 30 Min. lang weiter gerührt und der entstandene Niederschlag anschließend durch Zentrifugation abgetrennt.

b) Fraktionierung mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung

Volumina unter 1000 ml wurden mit bei 20°C gesättigter Ammoniumsulfatlösung (3,94M) fraktioniert. Die Ammoniumsulfatlösung wurde vor der Zugabe unter der Glaselektrode auf den gewünschten pH-Wert eingestellt und unter kräftigem Rühren aus einem Tropftrichter mit einer Geschwindigkeit von 250 ml/Std. zugegeben. Anschließend wurde 30 Min. lang weitergerührt und erst dann bei 14000 × g in der gekühlten Sorvall-Zentrifuge abzentrifugiert. Bei allen Fällungen wurde streng auf Temperaturkonstanz (im Standard-Präparationsgang 20°C) geachtet.

Auch die analytischen Salzfraktionen von Phosphofructokinase wurden auf diese Weise durchgeführt. Allerdings wurde bei Temperaturen unter 20°C 12 Std. auf die Gleichgewichtseinstellung gewartet.

Acetonfraktionierung

Aceton p. a. wurde mit einer Geschwindigkeit von 50 ml/Std. aus einer Bürette zugegeben. Gleichzeitig wurde kräftig gerührt. Die Temperatur wurde während der Zugabe auf -10°C gesenkt. Der entstandene Niederschlag wurde in der auf -10°C vorgekühlten Sorvall-Zentrifuge bei 14000 × g abgetrennt.

Hitzebehandlung

Die Hitzebehandlung wurde in einem thermostatisierten Wasserbad vorgenommen, in das ein 800 ml fassender

⁷ G. BEISENHERZ, H. J. BOLTZE, TH. BÜCHER, R. CZOK, K. H. GARBADE, E. MEYER-ARENDT u. G. PFLEIDERER, Z. Naturforsch. **8b**, 555 [1953].

⁸ W. C. SCHNEIDER, Methods in Enzymol. **3**, 680 [1957].

⁹ E. VOLKIN u. W. E. COHN, in Methods of Biochemical Analysis **1**, 286 [1954].

¹⁰ H. SCHNITTGER, K. PAPENBERG, E. GANSE, R. CZOK, TH. BÜCHER u. H. ADAM, Biochem. Z. **332**, 167 [1959].

¹¹ J. K. PARNAS u. R. WAGNER, Biochem. Z. **125**, 253 [1921].

Tab. 1. Abhängigkeit der Ausbeute an extrahierter Phosphofructokinase von der Zusammensetzung des Extraktionsmediums.

Extraktionsmedium	U	mg Prot.	U	relative Ausbeute [%]*
	g Gewebe	g Gewebe	mg Prot.	
Saccharose 0,1M, pH 6,3	8,75	31	0,28	10
KF 0,03M + EDTA 0,01M, pH 6,5	50	35	0,81	57
K-Phosphat 0,1M, pH 7,6	84,8	52	1,62	97
(NH ₄) ₂ SO ₄ 0,05M, pH 7,6	87,5	70	1,24	100
K-Phosphat 0,1M + EDTA 0,01M, pH 7,6	86,5	52	1,66	99
K-Phosphat 0,1M + AMP 0,001M, pH 7,6	83	52	1,57	95
K-Phosphat 0,1M + Na-Citrat 0,5mm, pH 7,6	83	52	1,57	95

* In % der maximal erzielten Ausbeute.

V-4A-Stahlbecher eingestellt wurde. Während der Hitzebehandlung wurde mit einem Motor kräftig gerührt. Die Temperaturmessung erfolgt im Becher. Die Hitzebehandlung wurde durch Einbringen des Bechers in ein Eisbad beendet.

Ergebnisse und Diskussion

1. EXTRAKTION DER PHOSPHOFRUCTOKINASE AUS SKELETMUSKEL

a) Abhängigkeit des Extraktionsverhaltens der Phosphofructokinase vom Extraktionsmedium

Die für das Extraktionsverhalten der Phosphofructokinase wesentlichen Qualitäten des Extraktionsmediums sind seine stoffliche Zusammensetzung, seine Ionenstärke, sein pH-Wert und außerdem sein Volumen im Verhältnis zur Gewebsmenge. Die vom Extraktionsmedium zu erfüllenden Eigenschaften stehen in enger Beziehung zur Lokalisation der Phosphofructokinase in der Zelle^{6,12,13}; intrazellulär liegt sie in einem leichtlöslichen und in einem schwerlöslichen Anteil vor. Das schwerlösliche Enzym ist wahrscheinlich an Zellstrukturen adsorbiert und kann nur durch hohe Ionenstärken desorbiert werden^{6,13,14}.

Tab. 1 gibt eine Übersicht über die Ausbeute und spezifische Aktivität der Phosphofructokinase bei Extraktion in verschiedenen Medien.

Durch 0,1M Saccharoselösung, einem Medium geringer Ionenstärke, werden nur 10% der maximal extrahierbaren Phosphofructokinase gewonnen. Die geringe Pufferkapazität dieses Extraktionsmediums kann im Extrakt einen pH-Abfall unter 7 nicht verhindern. Dies gilt auch für 30mm Kaliumfluorid mit 10mm EDTA-Zusatz (μ ca. 0,19). Nach den Angaben von LING et al.¹⁵ liefert dieses Extraktionsmedium bei leicht alkalischen pH-Wert wesentlich bessere Ausbeuten und höhere spezifische Aktivitäten. Die besten Ergebnisse zeigten 0,1M Phosphatpuffer (μ = 0,26) und 0,1M Ammoniumsulfatlösung (μ = 0,3) bei pH 7,6. Zusätze von Citrat, 5'-AMP oder 10mm EDTA, von denen eventuelle stabilisierende Wirkungen ausgehen könnten, veränderten die Ergebnisse nicht wesentlich.

α) Einfluß der Ionenstärke auf die Extrahierbarkeit von Phosphofructokinase

Bei Extraktion mit Phosphatpuffern von pH 7,6 wächst die Phosphofructokinase-Ausbeute mit steigender Ionenstärke (Abb. 1).

Durch 75mm Phosphatpuffer werden 93% der maximal extrahierbaren Phosphofructokinase aus dem Gewebe herausgelöst; durch 100mm Phosphatpuffer sind es 96%, eine Ausbeute, die sich auch bei Anwendung noch höherer Phosphatkonzentrationen im Extraktionspuffer nicht mehr verbessern läßt. Da bei höheren Ionenstärken der Anteil des mitextrahierten unspezifischen Proteins zunimmt, fällt die spezifische Aktivität bei Ionenstärken über 0,26 (entsprechend 0,1M Phosphat bei pH 7,6) im Extraktionsmedium ab.

¹² A. GUERRITORE, D. PETTE u. TH. BÜCHER, Boll. Soc. ital. Biol. sperim. **38**, 1763 [1962].

¹³ D. PETTE, in Praktische Enzymologie, Huber-Verlag, Bern 1968.

¹⁴ A. MARGRETH, C. CATANI u. S. CHIAFFINO, Biochem. J. **102**, 1966 [1967].

¹⁵ K. H. LING, F. MARCUS u. H. A. LARDY, J. biol. Chemistry **240**, 1893 [1965].

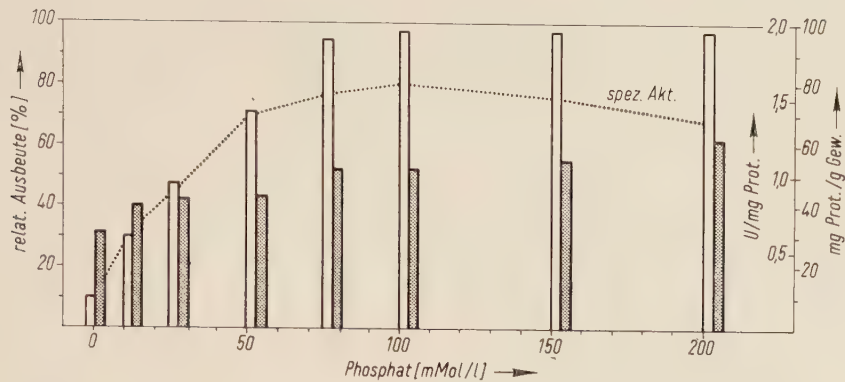


Abb. 1. Abhängigkeit der Ausbeute an extrahierter Phosphofructokinase von der Konzentration des zur Extraktion verwendeten Phosphatpuffers, pH 7,6. Weiße Balken: extrahierte Enzymaktivität in % der maximalen Ausbeute (100% bei dieser Versuchsserie = 87,5 U/g Muskel, vgl. Tab. 1 und 2). Punktierte Balken: extrahiertes Protein in mg/g Muskel. Die gestrichelte Linie gibt die spezifischen Aktivitäten (U/mg Protein) wieder. Die Extraktionsdauer betrug in jedem Fall 250 Min.

Der Zusatz von 10mm EDTA zu 0,1M Phosphatpuffer, pH 7,6, bringt eine geringfügige Steigerung der Extraktionsausbeute. Höhere EDTA-Konzentrationen verringern die Ausbeute, obwohl das extrahierte Gesamtprotein entsprechend der Erhöhung der Ionenstärke zunimmt.

Bei der Extraktion mit Ammoniumsulfatlösungen (pH 7,6) findet sich ein Optimum an Ausbeute und spezifischer Aktivität der Phosphofructokinase bei einer Konzentration von 50mm (Tab. 2), was der Ionenstärke eines 60mm Phosphatpuffers mit gleichem pH-Wert entspricht. Extraktion mit Ammoniumsulfatlösungen höherer Konzentration als 50mm führt zu abnehmender Ausbeute.

Tab. 2. Abhängigkeit der Ausbeute an extrahierter Phosphofructokinase von der Konzentration der zur Extraktion verwendeten Ammoniumsulfatlösung (pH 7,6). (Verdünnung bei der Extraktion 1:10, Extraktionsdauer 250 Min.)

Ammon.-sulfat [mMol/l]	U g Gewebe	mg Prot. g Gewebe	U mg Prot.	relative Ausbeute [%]
0	8,75	31	0,28	10
50	87,5	70	1,25	100
100	83	62	1,33	95
150	73	55	1,32	83,5

β) Einfluß des pH-Wertes der Extraktionslösung auf die Ausbeute an Phosphofructokinase

Tab. 3 zeigt das Ergebnis von Extraktionsversuchen mit 0,1M Phosphatpuffern von unterschiedlichen pH-Werten. Optimale Ausbeuten und spezifische Aktivitäten erhält man bei pH-Werten von 7,6 bis 8,0. Bei niedrigeren und höheren pH-Werten sinkt die Ausbeute ab.

Tab. 3. Abhängigkeit der Ausbeute an extrahierter Phosphofructokinase vom pH-Wert des Extraktionsmediums (0,1M Kaliumphosphat). (Verdünnung bei der Extraktion 1:10, Extraktionsdauer 250 Min.)

pH-Wert	U g Gewebe	mg Prot. g Gewebe	U mg Gewebe	relative Ausb. [%]
6,3	55	55	1,00	62,5
7,1	72,5	54	1,34	82
7,6	85	52	1,63	97
7,8	85	52	1,63	97
8,3	79	51	1,54	90
8,6	64	48	1,33	73

γ) Abhängigkeit der Phosphofructokinase-Ausbeute von der Relation Gewebe: Extraktionspuffer

Tab. 4 gibt die Ergebnisse von vier Extraktionen wieder, die an einem einheitlichen Ausgangsma-

terial vorgenommen wurden. Die Menge extrahierten Gesamtproteins nimmt mit zunehmender Verdünnung zu (1:5 bis 1:20), die Phosphofructokinase-Ausbeute dagegen erreicht bei einer Verdünnung von 1:15 ihr Optimum und nimmt bei der höheren Verdünnung stark ab.

Tab. 4. Abhängigkeit der Ausbeute an extrahierter Phosphofructokinase von der Verdünnung bei der Extraktion (Extraktion mit 0,1M Kaliumphosphat, pH 7,6, Extraktionsdauer 250 Min.).

$\frac{\text{g Gewebe}}{\text{ml Puffer}}$	$\frac{\text{U}}{\text{g Gewebe}}$	$\frac{\text{mg Prot.}}{\text{g Gewebe}}$	$\frac{\text{U}}{\text{mg Prot.}}$	relative Ausbeute [%]
1: 5	75	46	1,63	86
1:10	85	52	1,63	97
1:15	87	55	1,58	99
1:20	71,5	58	1,23	82

b) Abhängigkeit des Extraktionsverhaltens der Phosphofructokinase von den physikalischen Faktoren der Extraktion

Neben der Wahl eines geeigneten Extraktionsmediums sind eine Reihe anderer Faktoren, wie Vollständigkeit des mechanischen Gewebsaufschlusses, das Ausmaß der Konvektion während des Extraktionsvorganges und die dabei herrschende Temperatur sowie die Dauer der Extraktion von Bedeutung¹³. Diese Faktoren fördern die Einstellung des Gleichgewichts der Enzymkonzentration zwischen Gewebsphase und Extraktionsmedium. Sie sind, vor allem was Konvektion, Temperatur und Zeit betrifft, gegeneinander substituierbar.

Als ein innerhalb weiterer Grenzen frei wählbarer Faktor hat die Extraktionsdauer Bedeutung: In Abb. 2 ist die jeweilige Ausbeute an Phosphofructokinase in Abhängigkeit von der Extraktionsdauer aufgetragen. Extraktionsmedium ist 0,1M Phosphatpuffer + 0,01M EDTA (pH 7,6). Bereits nach 10 Min. sind 62% der maximal extrahierbaren Phosphofructokinase-Aktivität aus dem gut zerkleinerten Muskel herausgelöst; nach einer Stunde sind es 84% und nach 3 Std. 98%.

c) Beziehung zwischen Extraktionsverhalten der Phosphofructokinase und ihrer intrazellulären Lokalisation

In allen bisher untersuchten Geweben konnte eine Lokalisation der Phosphofructokinase im extra-

mitochondrialen cytoplasmatischen Zellraum nachgewiesen werden. Dennoch findet man bei Herz- und Skelettmuskel ein Extraktionsverhalten, das von dem anderer extramitochondrialer Enzyme bedeutend abweicht^{6, 12, 13}.

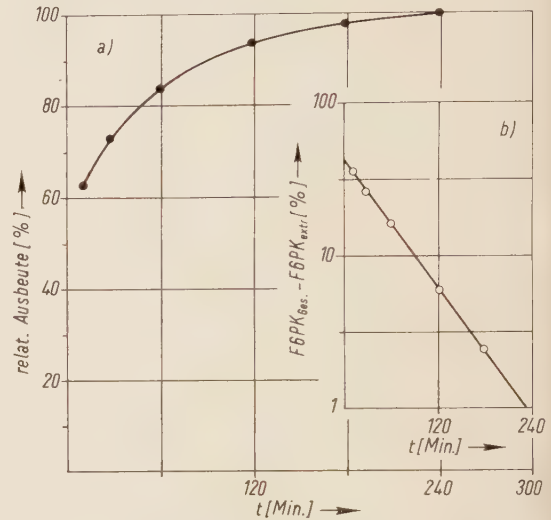


Abb. 2. a) Abhängigkeit der Ausbeute an extrahierter Phosphofructokinase (F6PK) von der Extraktionsdauer. Extraktionsmedium: 0,1M Kaliumphosphatpuffer + 10mm EDTA, pH 7,6. b) Abhängigkeit des Logarithmus der noch im Gewebe befindlichen, nichtextrahierten Phosphofructokinase-Menge ($F6PK_{\text{Gesamt}} - F6PK_{\text{extrahiert}}$) von der Extraktionsdauer.

Abb. 3 zeigt die graphische Darstellung des typischen Extraktionsverhaltens von vier Enzymen bei Anwendung der „fraktionierten Extraktion“¹³. Die Phosphoglycerat-Kinase kann als typisches extramitochondriales Enzym zu 95% mit 0,3M Saccharose extrahiert werden. Eine Extraktion der ausschließlich mitochondrial lokalisierten Citrat-Synthase erfolgt erst nach mechanischem Aufschluß der Mitochondrien. Die Aspartat-Aminotransferase wird zu etwa 35% mit Saccharose extrahiert, die restlichen 65% gewinnt man erst nach Homogenisation, ein Befund, der die sowohl extra- als auch intramitochondriale Lokalisation der Aspartat-Aminotransferase widerspiegelt.

Die Extraktion von 96% der zellulären Phosphofructokinase ohne vorherige Homogenisation des Gewebes beweist die ausschließlich extramitochondriale Lokalisation. Durch 0,3M Saccharose + 10mm Triäthanolamin-hydrochlorid + 2mm EDTA (pH 7,2) werden nur 65% der gesamten Phospho-

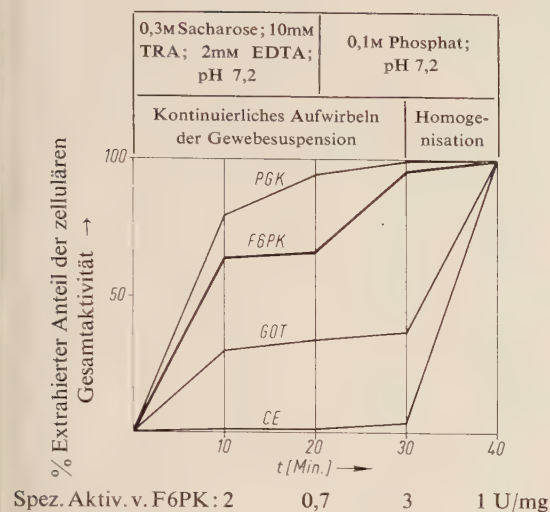


Abb. 3. Fraktionierte Extraktion von Phosphofructokinase (F6PK), Phosphoglycerat-Kinase (PGK), Aspartat-Aminotransferase (GOT) und Citrat-Synthase „condensing enzyme“ (CE) aus Kaninchenmuskel. Die in den einzelnen Extraktionsschritten freigesetzten Anteile der einzelnen Enzyme wurden im Verhältnis zu ihrer extrahierten Gesamtaktivität aufgetragen^{6,13}. In der untersten Zeile wurden die in den einzelnen Extrakten gemessenen Werte der spezifischen Phosphofructokinase-Aktivität verzeichnet. Die Bedingungen der Extraktion sind im oberen Teil der Abbildung kurz zusammengefaßt. TRA = Triäthanolamin-hydrochlorid.

fructokinase extrahiert. Die Anwendung verhältnismäßig hoher Ionenstärken, wie 0,1M Phosphatpuffer, pH 7,2 ($\mu = 0,25$), bewirkt die Extraktion

der restlichen 35 % des Enzyms mit außerordentlich hoher spezifischer Aktivität. Eine Erklärung für diesen Befund bietet die Annahme, ein Teil der Phosphofructokinase sei an intrazelluläre Strukturen wie Mitochondrien, Ribosomen¹⁴ oder Actinfilamente¹³ gebunden. Hierfür spricht die Möglichkeit, Enzyme reversibel an solche Strukturen zu binden^{13,16}. Andererseits ist nicht auszuschließen, daß die Phosphofructokinase in der Zelle teilweise in einem Aggregationszustand vorliegt, der nur durch hohe Ionenstärken in die lösliche Form des Enzyms übergeführt werden kann. Ebenso könnte durch hohe Phosphat- und Ammoniumkonzentrationen eine Reaktivierung inaktiver Phosphofructokinase erfolgen. In der Tat wurde eine zeitabhängige Aktivierung in einem phosphathaltigen Extrakt aus Taubenbrustmuskel beobachtet⁶; außerdem wurde nachgewiesen, daß eine solche Reaktivierung der Phosphofructokinase möglich ist^{17,18}.

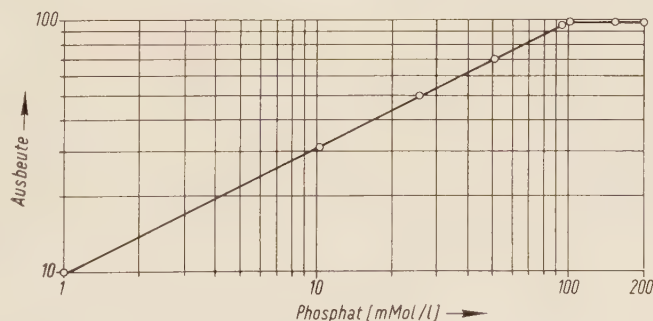
α) Abhängigkeit der Phosphofructokinase-Extraktion von der Phosphatkonzentration im Extraktionsmedium

Die Abhängigkeit der extrahierten Menge an Phosphofructokinase von der Phosphatkonzentration des Extraktionsmediums läßt sich in Analogie zur FREUNDLICH'S Adsorptionsisotherme¹⁹ durch die Beziehung

$$\lg [F6PK_{\text{extrahiert}}] = 0,5 \cdot \lg [\text{Phosphat}] + \lg K \quad (1)$$

ausdrücken (F6PK = Phosphofructokinase). Abb. 4 repräsentiert die graphische Darstellung der Gleichung 1.

Abb. 4. Abhängigkeit der Ausbeute an extrahierter Phosphofructokinase von der Phosphatkonzentration im Extraktionspuffer. Die Extraktion erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie in Abb. 1.



¹⁶ H. ARNOLD u. D. PETTE, diese Z. **348**, 1225 [1967].

¹⁷ T. E. MANSOUR, J. biol. Chemistry **240**, 2165 [1965].

¹⁸ H. W. HOFER u. D. PETTE, diese Z., in Vorbereitung.

¹⁹ H. FREUNDLICH, Z. physik. Chem. **57**, 385 [1907].

Der Faktor 0,5 entspricht dem Ausdruck $1/n$ für $n = 2$ in der FREUNDLICHschen Isotherme, der bei einer mehrschichtigen Adsorption für die Zahl n der Schichten steht. Eine Interpretationsmöglichkeit dieser experimentell gewonnenen Gleichung kann in der von der Phosphatkonzentration des Extraktionsmediums abhängigen Loslösung der Phosphofructokinase durch Verdrängung von ihren intrazellulären Bindungsstellen gesehen werden. Dabei gibt $n = 2$ die Zahl der zellulären Bindungsstellen an.

β) Zeitabhängigkeit der Phosphofructokinase-Extraktion

Ein weiterer Hinweis auf zwei unterschiedliche Lokalisationen der Phosphofructokinase in der Zelle folgt aus der Kinetik der Extraktion (vgl. Abb. 2): Setzt man die nach 240 Min. extrahierte Phosphofructokinase-Aktivität für die ursprünglich im Gewebe enthaltene Gesamtaktivität ein, so zeigt die Loslösung des Enzyms aus den Zellen die Kinetik einer Reaktion erster Ordnung bezüglich der Konzentration dieses Enzyms im Gewebe und gehorcht somit der Gleichung

$$-\frac{d[\text{F6PK}]_{\text{Gewebe}}}{dt} = k \cdot [\text{F6PK}]_{\text{Gewebe}} \quad [2]$$

(k = Proportionalitätskonstante; t = Zeit in Min.; F6PK = Phosphofructokinase).

Durch Integration erhält man aus

$$-\frac{[\text{F6PK}]_t}{[\text{F6PK}]_{t=0}} \int_{[\text{F6PK}]_{t=0}}^{\text{d} [\text{F6PK}]_{\text{Gewebe}}} = k \cdot \int_0^t dt \quad (3)$$

nach Überführen in den dekadischen Logarithmus die Beziehung

$$\lg [\text{F6PK}]_{\text{Gewebe}} = [\text{F6PK}]_{\text{Gewebe}}]_{t=0} - k \cdot t \quad (4)$$

Bei prozentualer Auftragung der Phosphofructokinase-Konzentration (gesamte zelluläre Phosphofructokinase = 100%) wurde aus Abb. 2 die Konstante k zu $7,15 \cdot 10^{-3} \text{M}$ bestimmt. Die Geschwindigkeitsgleichung 2 gilt nur für die Extraktion von 55% des gesamten Enzyms; die Extraktion der zum Zeitpunkt $t = 0$ scheinbar bereits im Extrakt vorhandenen 45% erfolgt zeitunabhängig und muß deshalb in ihrem Extraktionsmechanismus von der zeitabhängigen Extraktion des anderen Anteils unterschieden sein. Die Größe des zeitunabhängig extrahierbaren Anteils entspricht etwa dem Prozentsatz der Phosphofructokinase im Saccharoseextrakt bei der fraktionierten Extraktion (vgl. Abb. 3).

Die Zeitabhängigkeit der Extraktion muß nicht unbedingt durch die Strukturgebundenheit eines Teils der

Phosphofructokinase in der Zelle bedingt sein. Auch die zeitabhängige Reaktivierung inaktiver Phosphofructokinase durch Phosphationen könnte als Erklärung herangezogen werden. Eine solche Reaktivierung folgt aber nicht dem hier anzutreffenden einfachen Zeitgesetz, sondern weist eine wesentlich komplexere Kinetik auf¹⁸. Bei Extraktion in sehr starker Verdünnung, saurem pH-Wert im Gewebe bzw. Extraktion bei saurem pH und möglicherweise auch bei hohen EDTA-Konzentrationen im Extraktionsmedium ist mit einer Inaktivierung der Phosphofructokinase durch Dissoziation zu rechnen¹⁸. Das unter solchen Bedingungen extrahierte Enzym kann durch hohe Phosphat- und Ammoniumkonzentrationen tatsächlich reaktiviert werden. Bei den in Abb. 1, Abb. 2 und Abb. 4 dargestellten Experimenten spielen derartige Effekte allerdings keine Rolle. Das beobachtete Extraktionsverhalten erlaubt daher Rückschlüsse auf die intrazelluläre Verteilung der Phosphofructokinase. Dabei ist bislang nicht klar, ob der schwerextrahierbare Anteil des Enzyms an zelluläre Strukturen wie Membranen oder kontraktiles Protein gebunden ist oder ob er in einer nicht löslichen Aggregation vorliegt.

2. FÄLLUNG DER PHOSPHOFRUCTOKINASE MIT ANORGANISCHEN SALZEN

Die Fällung mit Ammoniumsulfat dient einem doppelten Zweck: der „fraktionierten Fällung“ als Reinigungsschritt einerseits und andererseits der Konzentrierung des Präparationsansatzes. In diesem Fall wirkt NH_4^+ zusätzlich als Stabilisator der Phosphofructokinase²⁰.

Voraussetzung für einen wirkungsvollen Einsatz der Methode ist die Konstanthaltung aller Parameter, welche die Löslichkeitseigenschaften der Phosphofructokinase beeinflussen, wie Salzart, Temperatur und pH-Wert, sowie die kontrollierte Erhöhung der Ionenstärke während der Durchführung der Fällung.

a) Salzfällung der Phosphofructokinase bei konstantem pH-Wert und konstanter Temperatur

α) Fällung mit Ammoniumsulfat

Abb. 5 setzt innerhalb des Fällungsbereiches die Aktivität der Phosphofructokinase in Beziehung zur Ionenstärke einer Ammoniumsulfatlösung. Die linke Kurve wurde an einer weitgehend vorgereinigten Präparation gewonnen, die rechte Kurve gibt die Löslichkeit der Phosphofructokinase in einem Fällungsansatz wieder, der von einem Rohextrakt ausging.

²⁰ J. A. MUNTZ, Arch. Biochem. Biophysics **42**, 435 [1953].

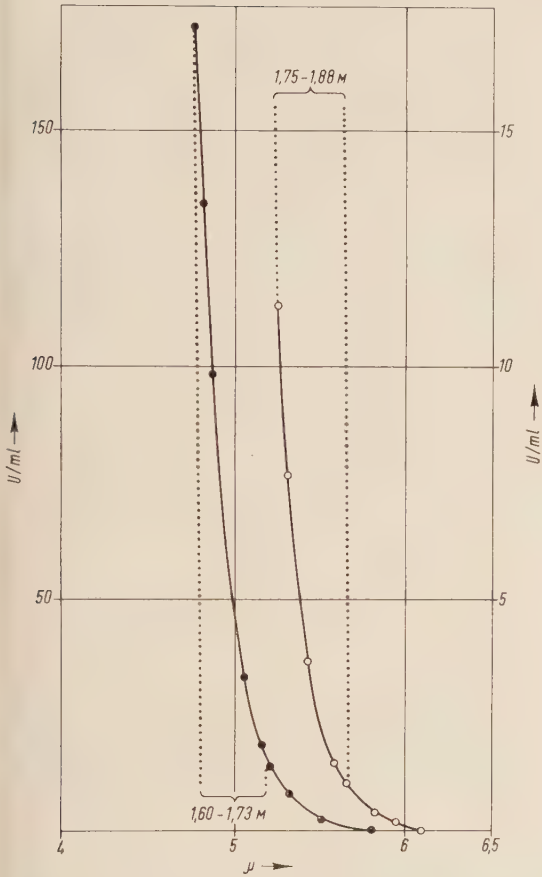


Abb. 5. Löslichkeit der Phosphofructokinase in Abhängigkeit von der Ionenstärke μ . Salz: Ammoniumsulfat, pH 7,6; Temperatur: 20°C. Die linke Ordinate ist der linken und die rechte Ordinate ist der rechten Kurve zugeordnet. ●—●: vorgereinigte Enzympräparation (spezif. Aktiv. 46 U/mg Protein, Konzentration 173 U/ml Lösung); ○—○: Rohextrakt (spezif. Aktiv. 1,6 U/mg Protein, Konzentration 11 U/ml Lösung). In den durch punktierte Linien gekennzeichneten Bereichen werden jeweils 90% der Aktivität gefällt.

Der Fällungsbereich des Ansatzes mit der geringeren Konzentration an Enzymprotein ist nach höheren Ionenstärken verschoben. Unter Berücksichtigung der verschiedenen Ordinatenmaßstäbe stimmen die Kurven jedoch überein.

In Abb. 6 wurden die Aktivitäten im logarithmischen Maßstab gegen die Ionenstärke aufgetragen. Für beide Phosphofructokinase-Präparationen ergeben sich Geraden nach der Gleichung

$$\lg A = b - a \cdot \mu$$
 (5)

(A = Aktivität der Phosphofructokinase in U/ml; a und b sind die Konstanten der Geraden). Durch Ersatz der Größe A (U/ml) durch E (Konzentration des Enzymproteins mg/ml) erhält man die von COHN²¹ angegebene Gleichung

$$\lg E = \beta - K_E \cdot \mu$$
 (6)

(β und K_E sind Konstanten). Der Fällungsbereich der Phosphofructokinase in Ammoniumsulfatlösungen hängt demnach sowohl von ihrer Konzentration als auch von der Ionenstärke der Ammoniumsulfatlösung ab. Wir berechnen die Ionenstärke des Eintritts in die Ammoniumsulfatfällung mit

$$\mu_u = \frac{b - \lg A}{a}$$
 (7)

Soll die Ausbeute $P\%$ der eingesetzten Phosphofructokinase betragen, so liegt die obere Fraktionierungsgrenze bei

$$\mu_0 = \frac{2 - \lg(100 - P) + b - \lg A}{a}$$
 (8)

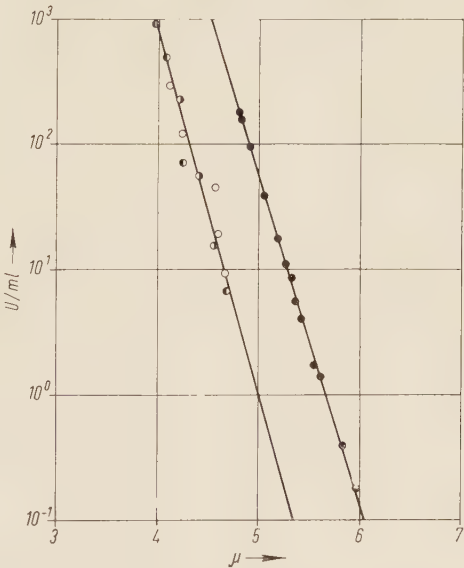


Abb. 6. Halblogarithmisches Löslichkeitsdiagramm der Phosphofructokinase in Abhängigkeit von der Ionenstärke μ . ●—●: Daten der Abb. 5 (Ammoniumsulfat, pH 7,6, Temperatur 20°C). ○—○; ●—● und ●—● (linke Gerade) repräsentieren die Löslichkeit der Phosphofructokinase in Ammoniumphosphat (pH 5,6, Temperatur: 20°C).

²¹ E. J. COHN, *Physiol. Rev.* 5, 349 [1925].

Für eine 90proz. Ausbeute vereinfacht sich diese Beziehung zu

$$\mu_0(90\%) = \frac{1 + b - \lg A}{a} \tag{9}$$

Bezeichnet man den Ionenstärkenbereich, in dem ein bestimmter Prozentsatz P_0 der Phosphofructokinase ausfällt, als

$$\Delta\mu = \mu_0 - \mu_u = \frac{2 - \lg(100 - P_0)}{a} \tag{10}$$

so erweist sich $\Delta\mu$ als unabhängig von der eingesetzten Phosphofructokinase-Konzentration. Zur Konstanten a ist $\Delta\mu$ umgekehrt proportional. Hohe Werte von a bedingen einen schmalen Fällungsbereich. Die Breite des Ionenstärkenbereichs, in dem ein gewünschter Prozentsatz ausfällt, nimmt bei steigendem P_0 exponentiell zu.

β) Fällung mit Ammoniumphosphat

Bei der Fällung mit Ammoniumphosphat zeigt die Phosphofructokinase ein analoges Verhalten wie bei der Fällung mit Ammoniumsulfat (Abb. 6). Hohe Phosphatkonzentrationen erhöhen aber ihre Stabilität in sauren Medien, wodurch die Fällung in einem pH-Bereich durchführbar wird, der sonst zu einer Inaktivierung des Enzyms führen würde.

b) Ammoniumsulfatfällungen bei unterschiedlichen pH-Werten

Abb. 7 zeigt die halblogarithmischen Löslichkeitsdiagramme der Phosphofructokinase in Ammoniumsulfatlösungen der pH-Werte 6,3; 7,6 und 8,5. Die Werte für b weisen nur geringe Schwankungen auf, die kleiner als 15% sind (Tab. 5). Die Werte von a variieren um $\pm 37\%$.

Tab. 5. Werte für die Konstanten a und b bei Fällung der Phosphofructokinase mit Ammoniumsulfat bzw. -phosphat bei verschiedenen pH-Werten und unterschiedlichen Temperaturen.

Fällungsmedium	pH-Wert	Temp.[°C]	a	b
Ammoniumphosphat	5,6	2	2,90	14,46
Ammoniumsulfat	6,3	2	1,92	11,30
Ammoniumsulfat	7,6	2	2,56	14,37
Ammoniumsulfat	8,5	2	1,68	11,34
Ammoniumsulfat	7,6	10	1,75	10,11
Ammoniumsulfat	7,6	25	1,40	8,16
Ammoniumsulfat	7,6	40	0,82	5,90

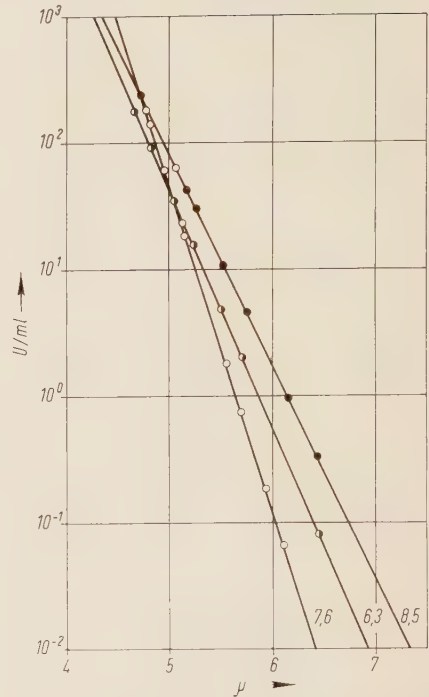


Abb. 7. Halblogarithmische Löslichkeitsdiagramme der Phosphofructokinase in Ammoniumsulfatlösungen bei pH 6,3, pH 7,6 und pH 8,5 (Temperatur: 20°C).

c) Ammoniumsulfatfällungen bei unterschiedlichen Temperaturen

Der Unterschied in den Löslichkeiten der Phosphofructokinase bei verschiedenen Temperaturen ist beträchtlich. So sind z. B. bei 1,3M Ammoniumsulfat und 20°C 23500 U Phosphofructokinase/ml löslich, während es bei 25°C nur noch 330 U/ml und bei 40°C 110 U/ml sind. Praktisch nutzen wir diese Eigenschaft bei unseren Kristallisationsversuchen, wo sich bei konstanter Ammoniumsulfatkonzentration allein durch Temperaturänderungen in einer entsprechend konzentrierten Phosphofructokinase-Lösung leicht reversible Übergänge von Fällung und Lösung herbeiführen lassen.

Halblogarithmische Löslichkeitsdiagramme der Phosphofructokinase-Aktivität bei Temperaturen von 2, 10, 25 und 40°C sind in Abb. 8 dargestellt. Bei Ionenstärken unter 5,3 nimmt die Löslichkeit mit steigender Temperatur ab; bei Ionenstärken über 5,3 nimmt sie mit steigender Temperatur zu. Bei der Ionenstärke 5,3, entsprechend einer Ammoniumsulfat-Konzentration von 1,77M ist die

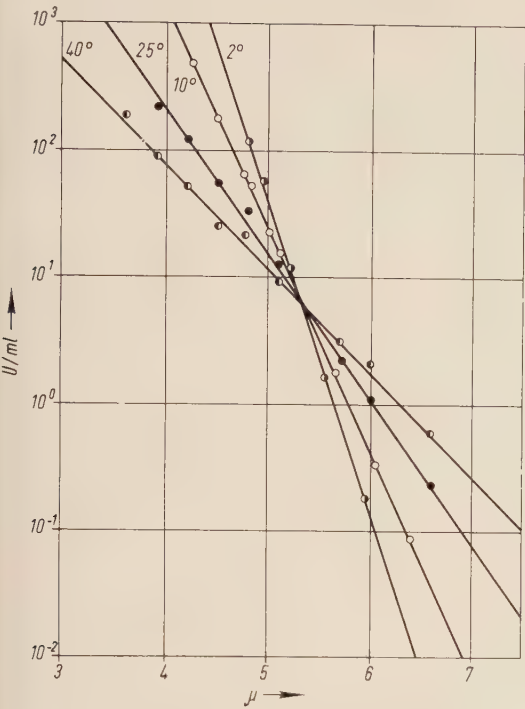


Abb. 8. Halblogarithmische Löslichkeitsdiagramme der Phosphofructokinase in Ammoniumsulfatlösungen in Abhängigkeit von der Temperatur bei pH 7,6.

Löslichkeit der Phosphofructokinase bei pH 7,6 von der Temperatur unabhängig und beträgt 6,3 U/ml.

Aus Abb. 9 geht die lineare Abhängigkeit von ln b

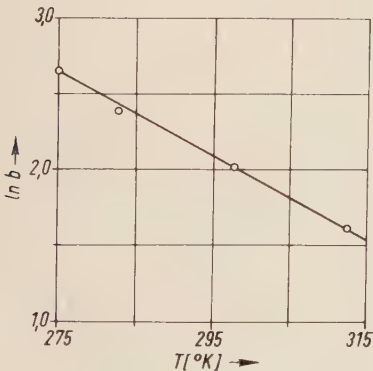


Abb. 9. Abhängigkeit des natürlichen Logarithmus von b (s. Gl. 5 u. Abb. 6) von der absoluten Temperatur (°K).

von der absoluten Temperatur hervor; ln a ist der absoluten Temperatur umgekehrt proportional (Abb. 10).

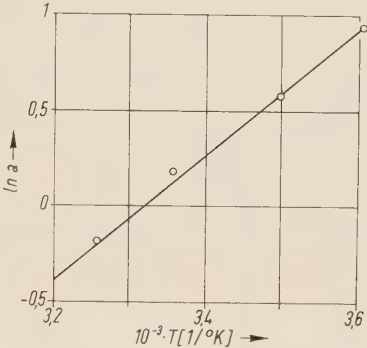


Abb. 10. Abhängigkeit des natürlichen Logarithmus von a vom reziproken Wert der absoluten Temperatur (1/°K).

d) Salzfüllungen in Systemen mit mehreren Protein-komponenten

Von Interesse ist das Verhalten mehrerer Proteine zueinander bei simultaner Fällung mit anorganischen Salzen. Vorausgesetzt, daß unsere modifizierte COHNsche Beziehung (Gleichung 5) auch für andere Proteine gilt, verhalten sich die Löslichkeiten zweier Proteine R und S wie

$$\lg \frac{R}{S} = \Delta b - \Delta a \cdot \mu \tag{11}$$

Dabei ist $\Delta b = b_R - b_S$ und $\Delta a = a_R - a_S$. Eine Verarmung des Fällungsüberstandes an der Komponente S — bei gleichzeitiger Anreicherung im Sediment — tritt bei $\Delta a < 0$, d. h. $a_S > a_R$, ein. Wenn $a_S = a_R$, bleibt das Verhältnis R/S im Überstand und im Sediment konstant. Bei $\Delta a > 0$, d. h. $a_S < a_R$, verarmt die Komponente R im Überstand bei entsprechender Anreicherung im Sediment.

Der Terminus $\lg R/S$ ist von der Ionenstärke μ linear abhängig. Die graphische Konstruktion der Löslichkeitsdiagramme und der Funktion $\lg R/S$ in Abhängigkeit von der Ionenstärke wird sehr vereinfacht durch die Anhaltspunkte, daß $\Delta b = b_R - b_S$ und $\lg R/S = \lg R$, wenn $\lg S = 0$ (vgl. Abb. 11). Die aufgezeigten, einfachen Beziehungen gelten stets dann, wenn die gelöste Phase zweier Proteine bei gleicher Ionenstärke mit ihren gefällten Phasen im Gleichgewicht steht. Beginnt die Ausfällung der Komponente R, entsprechend ihrer Ausgangskonzentration R' und der Beziehung $\lg R' = b_R - a_R \mu_{R'}$, bei Ionenstärke $\mu_{R'}$, und die Ausfällung der Komponente S mit der Ausgangskonzentration S' entsprechend $\lg S' = b_S - a_S \mu_{S'}$, bei $\mu_{S'}$, wobei $\mu_{S'} < \mu_{R'}$, so bleibt im Bereich zwischen den Ionenstärken $\mu_{S'}$ und $\mu_{R'}$ die Konzentration von R konstant R' , während die



Abb. 11. Halblogarithmische Lösungsdiagramme für zwei fiktive Proteine R und S und halblogarithmisches Diagramm (gestrichelt) für das Verhältnis von R/S im Fällungsüberstand in Abhängigkeit von der Ionenstärke μ .

Konzentration von S im Fällungsüberstand entsprechend der Ausfällung sinkt. Die Relation R'/S im Ionenstärkenbereich zwischen $\mu_{S'}$ und $\mu_{R'}$ läßt sich ausdrücken durch

$$\lg \frac{R'}{S} = \lg R' - b_S + a_S \mu \quad (12)$$

(vgl. Abb. 12).

3. FÄLLUNG DER PHOSPHOFRUCTOKINASE MIT ACETON

PETTE und KLOEPFER²² haben 1963 gezeigt, daß sich Phosphofructokinase durch verhältnismäßig geringe Acetonkonzentrationen fällen und damit anreichern läßt. Allerdings mußte wegen der geringen Stabilität des Enzyms in acetonhaltigen Lösungen ein ziemlich hoher Verlust in Kauf genommen werden. Durch Standardisierung von Temperatur und Fällungsdauer ist es mittlerweile gelungen, die Ausbeute auf 83% der theoretisch möglichen zu steigern.

Abb. 13 ist das graphische Protokoll eines Fällungsversuches mit Phosphofructokinase im Acetonmedium. Die Fällung beginnt in der Fraktion zwischen 25 und 30 Vol.-% Aceton, in der auch die höchste spezifische Aktivität im Sediment erreicht wird. In den Fraktionen von 35 bis 40 Vol.-% Aceton und von 40 bis 45 Vol.-% Aceton sind Ausbeute und spezifische Aktivität im Sedi-

ment nur noch gering. Allerdings übertrifft die spezifische Aktivität in der 35-bis-40-Vol.-%-Fraktion immer noch den Wert des Ausgangsmaterials.

In Abb. 13b ist der Verlauf des Abfalls der Phosphofructokinase-Aktivität im Überstand bei steigender Acetonkonzentration im halblogarithmischen Maßstab wiedergegeben. Im Fällungsbereich, d. h. bei Acetonkonzentrationen, bei denen präzipitiertes Enzym mit gelöstem im Gleichgewicht steht, folgt die Aktivität der Phosphofructokinase (F6PK) im Überstand der Gleichung

$$\lg [\text{F6PK}] = B - A \cdot [\text{Aceton}] \quad (13)$$

Unter den gewählten Versuchsbedingungen (25mm Phosphat, 360mm Ammoniumsulfat, pH 7,6) sind die Konstanten $A = 0,18$ und $B = 6,7$, wenn die Enzymkonzentration in U/ml und die Acetonkonzentration in Vol.-% angegeben werden.

Bei verhältnismäßig hohen Ionenstärken folgt die Fällung der Phosphofructokinase durch Aceton

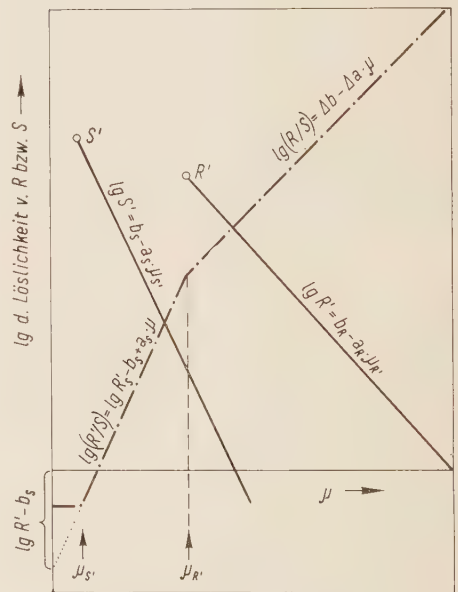


Abb. 12. Halblogarithmisches Diagramm der Konzentrationen von zwei fiktiven Proteinen R und S und ihres Konzentrationsverhältnisses bei simultaner Fällung in Abhängigkeit von der Ionenstärke μ .

R' und S' : tatsächliche Ausgangskonzentration der Komponenten R und S .

$\mu_{S'}$, $\mu_{R'}$: Ionenstärke, bei der die Gleichgewichtskonzentrationen von R und S die Größe R' und S' haben.

— · — · —: Verlauf von $\lg R/S$ in Abhängigkeit von der Ionenstärke μ .

²² J. KLOEPFER, Diplomarbeit Univ. Marburg 1964.

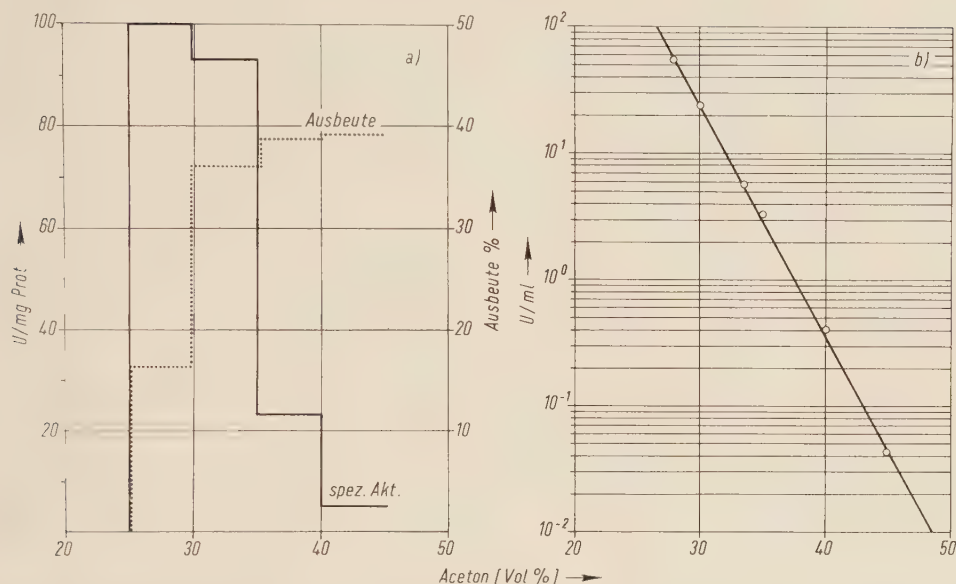


Abb. 13. a) Verhalten von spezifischer Aktivität (durchgezogene Linie) und Ausbeute (punktierte Linie) der Phosphofructokinase in den Sedimentsfraktionen bei Acetonfällung. Da bei der abgebildeten analytischen Fällung die optimale Fällungsdauer weit überschritten wurde, mußte eine gegenüber dem Standardverfahren um 50 % niedrigere Ausbeute hingenommen werden. b) Löslichkeit der Phosphofructokinase in Abhängigkeit von der Acetonkonzentration (halblogarithmische Darstellung). Das Fällungsmedium enthielt vor dem Acetonzusatz 25mM Kaliumphosphat und 360mM Ammoniumsulfat (pH 7,6).

somit einer analogen Gesetzmäßigkeit wie die Fällung durch anorganische Salze. Die oben abgeleiteten Beziehungen können deshalb auch zur Ermittlung der Fällungsgrenzen bei der Acetonfällung herangezogen werden. Anstelle der Ionenstärke μ ist der Volumenanteil des Acetons einzusetzen.

4. HITZEBEHANDLUNG DER PHOSPHOFRUCTOKINASE

a) Abhängigkeit der hitzebedingten Denaturierung der Phosphofructokinase von der Salzkonzentration und von der Konzentration des Enzyms

Bei der Anwendung der Hitzebehandlung zur Reinigung eines Enzyms hängt die Reinheitssteigerung nicht allein vom Verhalten des Enzyms, sondern auch von der Hitzestabilität des Fremdproteins ab. Der Anstieg der spezifischen Aktivität bei Erhitzung und die Effektivität der Reinigung lassen sich nur dann uneingeschränkt vergleichen, wenn dazu identisches Ausgangsmaterial herangezogen werden kann.

Erhitzt man Myogenfraktionen, in denen Phosphofructokinase durch die Ammoniumsulfatfällung ange-

reichert vorliegt, auf Temperaturen über 55°C, so kommt es durch Denaturierung zu einem ungefähr exponentiellen Abfall der Konzentration des gelösten Proteins. Die Phosphofructokinase ist bei dieser Temperatur noch beständig und ihre spezifische Aktivität steigt beträchtlich an. Die höchste spezifische Aktivität wird bei Inkubation in 50mM Phosphatpuffer (pH 7,6) bei 65°C und bei Inkubation in 100mM Phosphatpuffer bei 68°C erreicht (jeweils 15 Min.). Bei weiterer Temperaturerhöhung nimmt die spezifische Aktivität ab. Auch bei Temperaturen, die noch nicht zur optimalen Reinigung führen, kommt es zu einer teilweisen Inaktivierung der Phosphofructokinase.

Die „Effektivität der Reinigung“, die als das Produkt

$$\frac{(\text{Aktiv. / ml})_{\text{Ausgang}}}{(\text{Aktiv. / ml})_{\text{Ende}}} \cdot \frac{(\text{spezif. Aktiv.})_{\text{Ausgang}}}{(\text{spezif. Aktiv.})_{\text{Ende}}}$$

definiert werden kann, erreicht bei 15 Min. langer Inkubation sowohl in 50mM als auch in 100mM Phosphatpuffer ein schmales Maximum bei 64°C. Der Inaktivierungseffekt der Temperatur bei verschiedener Ausgangskonzentration der eingesetzten Phosphofructokinase und bei unterschiedlichem Inkubationsmedium ist in Abb. 14 gezeigt. Die Ausgangsaktivität wurde gleich 100 % gesetzt. Der Grad

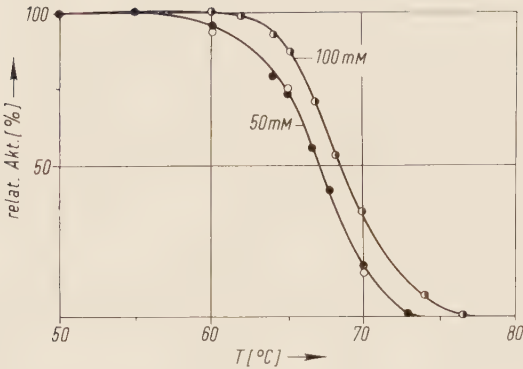


Abb. 14. Hitzeinaktivierung von Phosphofructokinase bei 15 Min. Inkubation. Die Aktivitäten wurden in Prozent des jeweiligen Ausgangswertes gegen die Inkubationstemperatur aufgetragen.

- : Inkubation von 65 U Phosphofructokinase/ml in 100mm Kaliumphosphat, pH 7,6.
- : Inkubation von 65 U Phosphofructokinase/ml in 50mm Kaliumphosphat, pH 7,6.
- : Inkubation von 225 U Phosphofructokinase/ml in 50mm Kaliumphosphat, pH 7,6.

der hitzebedingten Inaktivierung im untersuchten Bereich ist unabhängig von der Phosphofructokinase-Konzentration. Geringe Unterschiede er-

geben sich bei Veränderung des Mediums: die mit 100mm Phosphatpuffer gewonnene Kurve ist gegenüber der mit 50mm erhaltenen zu um 2°C höheren Temperaturen verschoben.

Die Konzentration der aktiven Phosphofructokinase in Abhängigkeit von der Temperatur T läßt sich nach 15 Min. Inkubation durch die Gleichung

$$\lg \frac{[F6PK_{\text{aktiv}}]}{1 - [F6PK_{\text{aktiv}}]} = m - n \cdot T \quad (14)$$

beschreiben. Die Werte der Konstanten sind:

Inkubation in	m	n
50mm Kaliumphosphat, pH 7,6	17,8	0,256
100mm Kaliumphosphat, pH 7,6	18,2	0,256

(Temperatur in °C; Konzentration der Phosphofructokinase (F6PK) in % der Ausgangskonzentration). Die Temperaturfunktion der Phosphofructokinase-Denaturierung weist somit in Abhängigkeit von der Phosphatkonzentration des Inkubationsmediums eine Änderung nur im konstanten Glied auf.

b) Zeitabhängigkeit der hitzebedingten Phosphofructokinase-Denaturierung

Abb. 15 gibt die Daten einer Versuchsserie wieder, bei der Proben eines einheitlichen Ausgangsmaterials verschieden lange einer Temperatur von 65°C ausgesetzt waren. Der Hitzelabilität des größ-

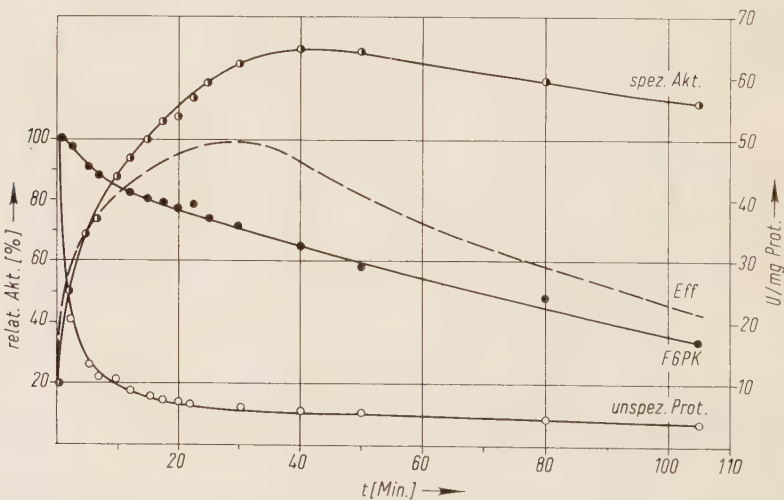


Abb. 15. Hitzebeständigkeit von Phosphofructokinase (●—●) und unspezifischem Protein (○—○) bei 65°C in Abhängigkeit von der Dauer der Hitzeeinwirkung (Inkubation in 0,1M Phosphat, pH 7,6). ●—●: spezif. Aktivität (U/mg Protein). — — —: „Effektivität der Reinigung“ in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer (zur Definit. vgl. S. 1007). Die Auftragung erfolgte in Proz. der optimalen Reinigungseffektivität unter den gewählten Bedingungen.

ten Teils des Fremdproteins entspricht der rasche Abfall an Gesamtprotein innerhalb der ersten 15 Minuten.

Den Verlust an Phosphofructokinase-Aktivität in Abhängigkeit von der Zeit beschreibt die Funktionsgleichung:

$$\lg [F6PK_{\text{aktiv}}] = 2 - p \cdot t \quad (15)$$

(Die Konzentration der aktiven Phosphofructokinase (F6PK) muß in % der Ausgangskonzentration eingesetzt werden!). Bei 65°C und Inkubation in 100mm Kaliumphosphatpuffer, pH 7,6, hat die Konstante p den Zahlenwert $5,25 \cdot 10^{-3}$. Die Gleichung 15 ist eine Lösung der differentiellen Beziehung

$$\frac{d [F6PK_{\text{denaturiert}}]}{dt} = p' \cdot [F6PK_{\text{aktiv}}], \quad (16)$$

die als die Geschwindigkeitsgleichung der Phosphofructokinase-Denaturierung angesehen werden muß.

c) Hitzebehandlung und Acetonfällung von Phosphofructokinase in Abhängigkeit von der Vorbehandlung

Die Inaktivierung der Phosphofructokinase durch Hitze zeigt außer der Abhängigkeit von den bisher geschilderten Parametern auch eine solche von der Art der Vorbehandlung.

Tab. 6 gibt Versuchsergebnisse wieder, die durch 10 Min. Erhitzung auf 65°C von nicht vorbehandeltem acetongefälltem Material gewonnen wurden. Da bei den Versuchen (Tab. 6 und 7) unterschiedliche Ausgangspräparationen verwendet wurden, dürfen die spezifischen Aktivitäten nur mit der jeweiligen Kontrolle verglichen werden.

Tab. 6. Einfluß der Hitzebehandlung auf Ausbeute und spezif. Aktivität der Phosphofructokinase in Abhängigkeit von der Vorbehandlung.

Vorbehandlung	Ausgangs- material		nach Hitzebehandlung (10 Min., 65°C)		Ausbeute [%]
	U/ml	U/mg	U/ml	U/mg	
keine	220	9,3	197	64	90
Acetonfällung	17	95	0	0	0

Bei der Hitzebehandlung von Phosphofructokinase, die bereits einer Acetonfällung ausgesetzt war, kommt es zu einer totalen Inaktivierung. Die ver-

minderte Beständigkeit beruht sicher nicht auf der geringeren Enzymkonzentration, außerdem ist die Ausbeute aktiver Phosphofructokinase bei der Hitzebehandlung ohnehin vom Begleitprotein unabhängig. Es muß daher angenommen werden, daß bei der Acetonfällung das Phosphofructokinase-Molekül in einer Weise verändert wird, die eine erhöhte Labilität gegen Hitzeeinwirkung bedingt.

Auch bei der Acetonfraktionierung hitzebehandelter Phosphofructokinase ist die Ausbeute wesentlich geringer als bei nicht vorbehandeltem Enzym (vgl. Tab. 7).

Tab. 7. Einfluß der Acetonfällung auf Ausbeute und spezif. Aktivität der Phosphofructokinase in Abhängigkeit von der Vorbehandlung.

Vorbehandlung	Ausgangs- material		nach Acetonfällung		Ausbeute [%]
	U/ml	U/mg	U/ml	U/mg	
keine	220	9,3	160	73	73
Hitzebehandlung (10 Min., 65°C)	1200	85	22		1,8

5. IONENAUSTAUSCHCHROMATOGRAPHIE VON PHOSPHOFRUCTOKINASE

Phosphofructokinase wird an DEAE-Sephadex-Phosphat bei pH 7,6 ziemlich fest gebunden und erst durch Anwendung vergleichsweise hoher Ionenstärken wieder eluiert¹².

Vorgereinigte Phosphofructokinase mit einer spezif. Aktivität von 100 bis 120 U/mg Protein wird zweimal 60 Min. gegen ein 1000faches Volumen von 40mm Natriumphosphat + 1mm EDTA + 0,2mm Fructose-1,6-diphosphat bei pH 7,6 dialysiert und anschließend auf eine mit DEAE-Sephadex-Phosphat gefüllte Chromatographiesäule (30 × 2 cm) gebracht. Daraufhin wird die Säule mit Puffer obiger Zusammensetzung solange eluiert, bis nach Erscheinen eines großen Proteingipfels die Extinktion des Eluats bei 280 und 265 m μ wieder auf den Ausgangswert gesunken ist. Die weitere Elution erfolgt mit einem linearen Phosphatgradienten, der innerhalb von 200 ml auf eine Konzentration von 400mm Natriumphosphat + 1mm EDTA + 0,2mm Fructosediphosphat (pH 7,6) ansteigt. Zwischen 100 und 200mm Phosphatkonzentration wird die Phosphofructokinase in einem einzigen Peak eluiert (vgl. Abb. 16).

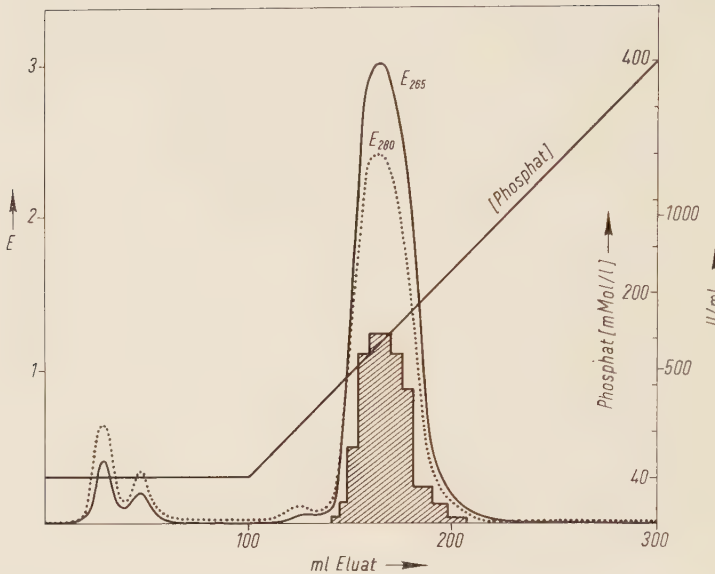


Abb. 16. Elutionsdiagramm einer präparativen Chromatographie von Phosphofructokinase an DEAE-Sephadex (Phosphat) A-50. Fortlaufende Messung der Absorption des Eluats bei 280 (.....) und 265 m μ (—). Die schraffierte Fläche gibt die Phosphofructokinase-Konzentration in den einzelnen Fraktionen wieder.

6. KRISTALLISATION VON PHOSPHOFRUCTOKINASE

Zur Kristallisation wird die Phosphofructokinase in einer Modifikation des Verfahrens von PARMEGGIANI und KREBS¹ gegen eine Lösung von 1,3M Ammoniumsulfat + 0,1M Kaliumphosphat + 4mM ATP bei pH 7,6 dialysiert. Durch regelmäßiges Erwärmen auf 25°C und Abkühlen auf 0°C im Wechsel von 2 Tagen erzwingen wir unter Ausnutzung der Temperaturabhängigkeit der Löslichkeit dieses Enzyms Fällungen und Lösungen des Enzyms. Die Kristallisation benötigt bei Präparaten mit einer Ausgangsreinheit von 110 U/mg Protein drei bis vier Wochen. Bei Präparaten mit einer Reinheit von 220 bis 240 U/mg Protein erfolgt die Kristallisation bereits nach vier Tagen.

Die Kristalle sind zunächst großflächig, hexagonal und vergrößern sich im Verlauf mehrerer Wochen beträchtlich. Nach einiger Zeit tritt auch eine dichte Population etwas kleinerer und länglicher Kristalle auf.

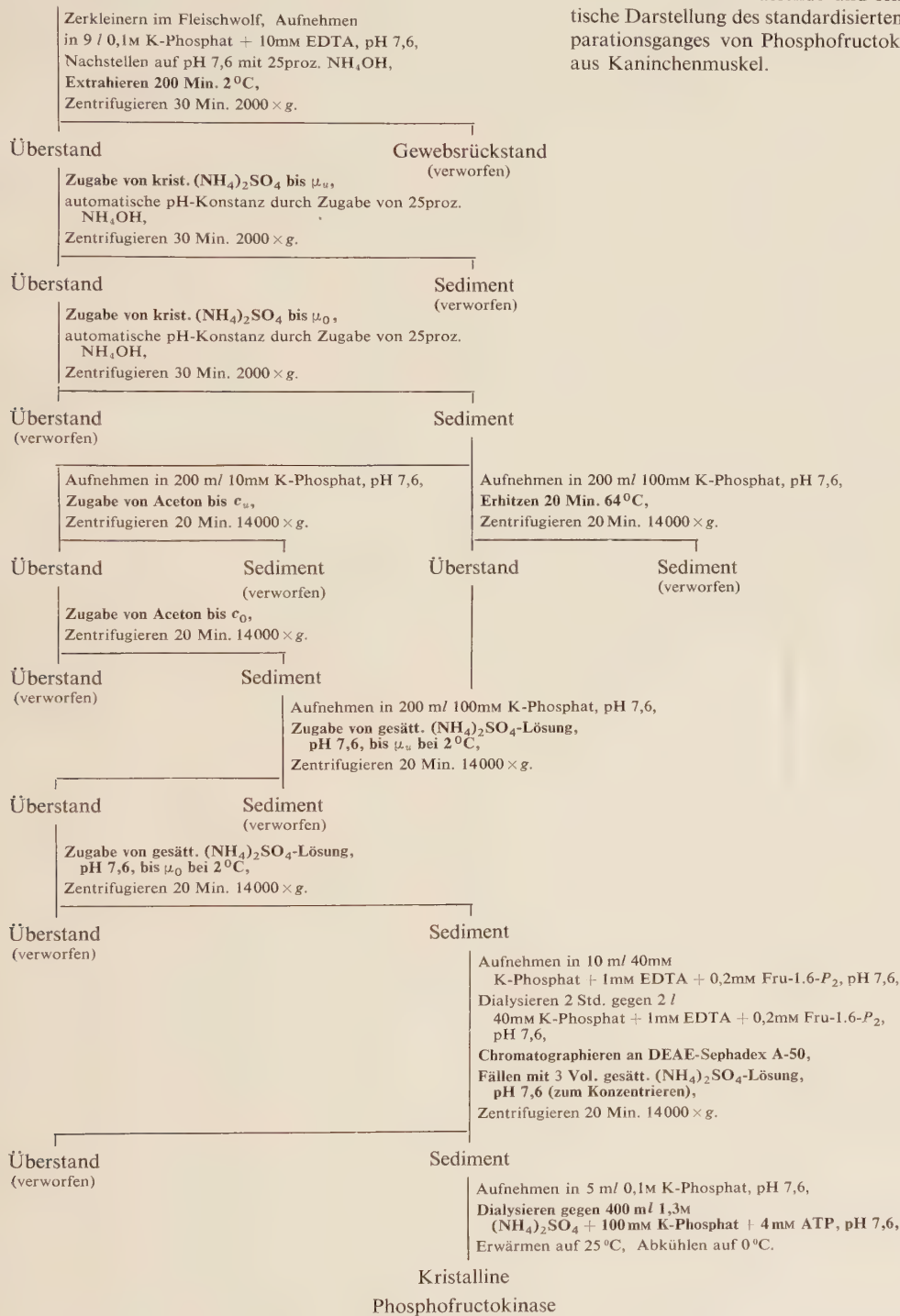
Die großen hexagonalen Kristalle sind doppelbrechend: Im mikroskopischen Gesichtsfeld läßt im polarisierten Licht nur ein Teil der Kristalle Licht durch. Nach Drehen der Polarisationssebene um 90° ist die Lichtdurchlässigkeit für die vorher undurchsichtigen Kristalle maximal.

7. STANDARDISIERTER PRÄPARATIONSGANG FÜR PHOSPHOFRUCTOKINASE

Die in den vorangegangenen Kapiteln dargestellten Ergebnisse besagen, daß jedes der für die Reinigung der Phosphofructokinase von uns angewandten Verfahren hinsichtlich seines Reinigungseffektes kalkulierbar ist. Für jede der angeführten Reinigungsmethoden ist dabei die präparative Ausnutzung der optimalen Reinigungseffektivität gebunden an die Kenntnis der zugrunde liegenden Gesetzmäßigkeiten mit ihren Variablen und experimentell bestimmbaren Konstanten. Unter diesen Voraussetzungen führt die Kombination der Verfahren zu einem optimalen Reinigungsgang. Mit seinen wichtigsten Nebenwegen ist dieser Reinigungsgang in Abb. 17 schematisch dargestellt. Hitzebehandlung und Acetonfraktionierung sind in diesem Schema als gleichberechtigte Alternativen der Reinigung aufgeführt. Infolge der technisch leichter auszuführenden Hitzebehandlung haben wir sie bei der Standardpräparation der Phosphofructokinase der Acetonfällung vorgezogen. Der Verlauf unseres Standardverfahrens (mit Hitzebehandlung) ist im Hinblick auf die in den einzelnen

Kaninchenmuskel (1000 g)

Abb. 17. Zusammenfassende und schematische Darstellung des standardisierten Präparationsganges von Phosphofructokinase aus Kaninchenmuskel.



Schritten erzielten Reinheiten und Ausbeuten in Tab. 8 zusammengefaßt. Die hohe und noch vor der Kristallisation des Enzyms erzielte Reinheit kann im Vergleich zu den von anderen Autoren erzielten Reinheiten als ein Kriterium für die Effektivität des Verfahrens angesehen werden.

Im Hinblick auf unsere früher mitgeteilten Untersuchungen^{4, 6, 23, 24} ist von Interesse, daß der nunmehr standardisierte Präparationsgang zu Phosphofructokinase-Präparationen gleicher Reinheit, aber dennoch unterschiedlichem Gehalt an Nucleinsäure führt. Der Nucleinsäuregehalt ändert den Verlauf der einzelnen Reinigungsschritte nicht. Einflüsse der Nucleinsäure fanden wir nur auf die Neigung der Phosphofructokinase zur Kristallisation. Von Präparationen unterschiedlichen Nucleinsäuregehaltes, jedoch gleicher und höchster Reinheit wurden allein die nucleinsäurefreien Präparationen zur Kristallisation gebracht. Im Hinblick auf die unterschiedlichen kinetischen Eigenschaften von nucleinsäurefreien und nucleinsäurehaltigen Phosphofructokinase-Präparationen erwies sich darum

das kristallisierte Enzym nicht als das mit der Präparation angestrebte optimale Ausgangsmaterial für kinetische Messungen. Als optimal für derartige Messungen erwies sich das bis zum letzten Schritt vor der Kristallisation gereinigte und konzentrierte Enzym. Diese Präparate zeigten bei höchster Reinheit Unterschiede des Nucleinsäuregehaltes, und damit entsprechende Unterschiede des kinetischen Verhaltens, über die in einer weiteren Mitteilung ausführlich berichtet werden soll¹⁸.

Tab. 8. Reinheit und Ausbeute bei standardisierter Präparation von Phosphofructokinase aus Kaninchenmuskel.

	U _{Gesamt}	mg Prot.	$\frac{U}{\text{mg Prot.}}$	Ausbeute [%]
Rohextrakt	90 000	71 000	1,1	100
1. Ammoniumsulfatfällung	47 000	3 470	13,5	55
Hitzebehandlung	45 000	680	66,0	50
2. Ammoniumsulfatfällung	22 500	160	140,0	25
DEAE-Sephadex-Chromatographie	18 000	75	240	20

²³ H. W. HOFER u. D. PETTE, *Life Sci.* **4**, 1597 [1965].

²⁴ H. W. HOFER u. D. PETTE, *Life Sci.* **5**, 199 [1966].

Zusammenfassung: Phosphofructokinase wird durch niedrige Konzentration, saures Milieu, durch Behandlung mit *p*-Chlormercuri-benzoat oder Harnstoff inaktiviert. Die quantitative Analyse der Konzentrations- und der pH-abhängigen Inaktivierung des Enzyms führt zur Ableitung relativ einfacher kinetischer Gleichungen. Die erhaltenen Gleichungen lassen vermuten, daß der Verdünnungs- und pH-abhängigen Inaktivierung ein gemeinsamer Reaktionstyp zugrunde liegt. Demnach beruht die Inaktivierung wahrscheinlich auf einer Dissoziation des Enzyms in 2 Untereinheiten, der eine Aufnahme von 4 Protonen parallel geht. Sowohl die Konzentrations- als auch die pH-abhängige Inaktivierung ist partiell reversibel. Die kinetische Analyse des

Reaktivierungsvorganges stellt jedoch klar, daß die Reaktivierung einem anderen Reaktionstyp folgt als die Inaktivierung. Die Inaktivierung des Enzyms durch *p*-Chlormercuri-benzoat unterscheidet sich von der Konzentrations- und pH-abhängigen Inaktivierung und beruht ohne Zweifel auf einem anderen Reaktionsmechanismus. Bei der SH-Gruppentitration lassen sich pro 93 500 g Phosphofructokinase 2 Mol Sulfhydrylgruppen bestimmen. Die bei gleichzeitiger Kontrolle der Enzymaktivität durchgeführte Titration der SH-Gruppen führt zum Nachweis von 8 SH-Gruppen, die für die katalytische Aktivität der kleinsten aktiven Einheit der Phosphofructokinase essentiell sind.

Summary: *Active and inactive forms of phosphofructokinase from the skeletal muscle of the rabbit.* Phosphofructokinase is inactivated by dilution, acid pH, *p*-chloromercuribenzoate and treatment with urea. A quantitative analysis of the inactivation caused by dilution and acid pH leads to the deduction of relatively simple kinetic equations. These equations suggest a common mechanism of inactivation by acid pH and dilution. The inactivation consists most probably in a dissociation into two subunits and is accompanied by the consumption of four protons. The inactivation by dilution and acid pH is partly reversible. However,

a kinetic analysis of the reactivation shows that it follows a reaction type different from that of inactivation. Inactivation in the presence of *p*-chloromercuribenzoate is certainly due to a different reaction from that of pH- and dilution inactivation. 2 Moles of sulphhydryl groups are titrated per 93 500 g of phosphofructokinase. From the data obtained by the titration of sulphhydryl groups under simultaneous control of the enzyme activity, it can be concluded that 8 SH-groups are essential for the catalytic activity of the smallest active unit of phosphofructokinase.

Enzyme:

Aldolase, Ketose-1-phosphat-Aldolase, Ketose-1-phosphat-Aldehyd-Lyase (EC 4.1.2.7)

Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase, L-Glycerin-3-phosphat: NAD-Oxydoreduktase (EC 1.1.1.8)

Phosphofructokinase, ATP:D-Fructose-6-phosphat-1-Phosphotransferase (EC 2.7.1.11)

Triosephosphat-Isomerase, D-Glycerinaldehyd-3-phosphat-Ketol-Isomerase (EC 5.3.1.1)

* Der DEUTSCHEN FORSCHUNGSGEMEINSCHAFT danken wir für die großzügige Unterstützung unserer Arbeiten.

** Neue Adresse: Fachbereich Biologie, Universität Konstanz, Postfach 733, D-755 Konstanz.

Nach der von BÜCHER und RÜSSMANN¹ getroffenen Einteilung der glykolytischen Reaktionen in „Fall- und Staustrecken“, ist die von der Phosphofructokinase katalysierte Reaktion als sogenannte Fallstrecke einzuordnen. Nach den von HOHORST, REIM und BARTELS² mitgeteilten Metabolitmustern befindet sich das System der Phosphofructokinase im ruhenden Muskel im Ungleichgewicht und strebt bei tetanischer Kontraktion dem Gleichgewicht zu, ohne es allerdings zu erreichen. Die Regulierbarkeit der Reaktion, deren Voraussetzung das bestehende Ungleichgewicht ist, bleibt dadurch erhalten.

In einer Kette von enzymatisch katalysierten Reaktionen kann ein Ungleichgewicht unter anderem durch einen Mechanismus aufrecht erhalten werden, der die enzymatische Wirkung vorübergehend ausschaltet, so daß die energiereichere Seite als „potentielle Energie“ fixiert wird. Im Falle der Phosphofructokinase scheint dieses Prinzip verwirklicht zu sein: durch einen komplexen Mechanismus kann die katalytische Aktivität des Enzyms so reguliert werden, daß beliebige Ungleichgewichte aufrechterhalten werden können. In Zusammenhang damit stehen folgende Gegebenheiten: 1. ist die maximale Katalyseleistung der Phosphofructokinase im Gewebe im Vergleich zu anderen Glykolyseenzymen gering, und 2. ist die Hemmung des Enzyms durch ATP und Citrat, die von VIÑUELA, SALAS und SOLS³ im Sinne einer „metabolischen Endprodukthemmung“ gedeutet wurde, eine Eigenschaft von regulatorisch entscheidender Bedeutung.

Wichtige Einblicke in den Steuermechanismus der Phosphofructokinase-Aktivität vermitteln die Arbeiten von MANSOUR⁴⁻⁸, NEWSHOLME und Mitarbeitern^{9,10}, LARDY und Mitarbeitern¹¹⁻¹⁴, LOWRY

und PASSONNEAU¹⁵⁻¹⁸, PARMEGGIANI und KREBS¹⁹⁻²², SOLS und Mitarbeitern^{3,23,24} und UYEDA und RACKER^{25,26}. Hinweise auf den Kontrollmodus der Glykolyse ergeben sich auch aus den in dieser Arbeit untersuchten molekularen Eigenschaften des Enzyms.

Methoden

1. Optische Phosphofructokinase-Tests

Alle optischen Tests wurden bei 25°C in Küvetten mit 1 cm Schichtdicke in einem Testvolumen von 1 ml durchgeführt. Die Messungen erfolgten bei 366 mμ im registrierenden Photometer. Alle Ergebnisse wurden an hoch gereinigten, aber nicht kristallinen Enzympräparaten gewonnen²⁷.

¹⁰ H. UNDERWOOD u. E. A. NEWSHOLME, *Biochem. J.* **95**, 868 [1965].

¹¹ H. A. LARDY u. R. E. PARKS JR., in O. GAEBLER, *Enzymes, Units of Biological Structure and Function*, p. 584, Academic Press, New York 1956.

¹² K. H. LING, F. MARCUS u. H. A. LARDY, *J. biol. Chemistry* **240**, 1893 [1965].

¹³ K. H. LING, V. PAETKAU, F. MARCUS u. H. A. LARDY, *Methods in Enzymol.* **9**, 425 [1966].

¹⁴ V. PAETKAU u. H. A. LARDY, *J. biol. Chemistry* **242**, 2035 [1967].

¹⁵ J. V. PASSONNEAU u. O. H. LOWRY, *Biochem. biophys. Res. Commun.* **7**, 10 [1962].

¹⁶ J. V. PASSONNEAU u. O. H. LOWRY, *Biochem. biophys. Res. Commun.* **13**, 372 [1963].

¹⁷ O. H. LOWRY u. J. V. PASSONNEAU, *J. biol. Chemistry* **239**, 18 [1964].

¹⁸ O. H. LOWRY u. J. V. PASSONNEAU, *J. biol. Chemistry* **241**, 2268 [1966].

¹⁹ A. PARMEGGIANI u. E. G. KREBS, *Biochem. biophys. Res. Commun.* **19**, 89 [1965].

²⁰ A. PARMEGGIANI u. R. H. BOWMAN, *Biochem. biophys. Res. Commun.* **12**, 268 [1963].

²¹ A. PARMEGGIANI, H. LUFT, D. S. LOVE u. E. G. KREBS, *J. biol. Chemistry* **241**, 4625 [1966].

²² R. C. KEMPF u. E. G. KREBS, *Biochemistry* [Washington] **6**, 423 [1967].

²³ M. L. SALAS, E. VIÑUELA, M. SALAS u. A. SOLS, *Biochem. biophys. Res. Commun.* **19**, 371 [1965].

²⁴ E. VIÑUELA, M. L. SALAS, M. SALAS u. A. SOLS, *Biochem. biophys. Res. Commun.* **15**, 243 [1964].

²⁵ K. UYEDA u. E. RACKER, *J. biol. Chemistry* **240**, 4689 [1965].

²⁶ K. UYEDA u. E. RACKER, *J. biol. Chemistry* **240**, 4682 [1965].

²⁷ H. W. HOFER u. D. PETTE, *diese Z.* **349**, 995 [1968].

¹ TH. BÜCHER u. W. RÜSSMANN, *Angew. Chem.* **75**, 881 [1963].

² H. J. HOHORST, M. REIM u. H. BARTELS, *Biochem. biophys. Res. Commun.* **7**, 137 [1962].

³ E. VIÑUELA, M. L. SALAS, M. SALAS u. A. SOLS, *Biochem. biophys. Res. Commun.* **15**, 243 [1964].

⁴ T. E. MANSOUR u. E. BUEDING, *Brit. J. Pharmacol. Chemotherapy* **9**, 459 [1954].

⁵ T. E. MANSOUR, *J. biol. Chemistry* **240**, 2165 [1965].

⁶ T. E. MANSOUR, H. C. FROEDE u. C. E. AHLFORS, *Federat. Proc.* **26**, 560 [1967].

⁷ T. E. MANSOUR, N. W. WAKID u. H. M. SPROUSE, *Biochem. biophys. Res. Commun.* **19**, 721 [1965].

⁸ T. E. MANSOUR u. J. M. MANSOUR, *J. biol. Chem.* **237**, 629 [1965].

⁹ P. B. GARLAND, P. J. RANDLE u. E. A. NEWSHOLME, *Nature* [London] **200**, 169 [1963].

Test A:

Triäthanolamin-Puffer 50mM; Äthylendiamin-tetraacetat (EDTA) 5mM; MgSO_4 8mM; Fructose-6-phosphat (Fru-6-P) 2mM; Adenosintriphosphat (ATP) 1mM; NADH 0,2mM; Aldolase 5 μg ; Triosephosphat-Isomerase 1 μg ; Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase 3 μg ; pH 7,6.

Test B:

Glycyl-glycin-Puffer (bzw. Imidazol-Puffer) 50mM; MgCl_2 4,0mM; Fru-6-P 2,0mM; ATP 2,5mM; NADH 0,2mM; Aldolase 8 μg ; Triosephosphat-Isomerase 3 μg ; Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase 5 μg ; pH 7,1.

Mit Ausnahme der in Testsystem A verwendeten, wurden alle Hilfsenzyme durch Behandlung mit Sephadex G-25 entsalzt.

2. Titrimetrischer Phosphofructokinase-Test

Das bei der Phosphofructokinase-Reaktion entstehende Proton kann im ungepufferten Testsystem durch automatische Zugabe („Titrigraph“ der Fa. Radiometer) von NaOH neutralisiert werden. Die Empfindlichkeit des Tests läßt sich durch Änderung der NaOH-Normalität variieren.

Test C:

Fru-6-P 2,0mM; ATP 2,0mM; MgCl_2 4mM; Titration mit 0,01N NaOH. Testvolumen 3 ml; Temperatur 39°C; Automatische pH-Konstanz bei pH 7,6.

3. Bestimmung der Sulfhydrylgruppen

Die Titration der zugänglichen SH-Gruppen wurde mit *p*-Chlormercuri-benzoat nach²⁸ durchgeführt.

Ergebnisse**1. Inaktivierung der Phosphofructokinase durch Verminderung der Enzymkonzentration**

Die Phosphofructokinase weist in einem bestimmten Konzentrationsbereich eine deutliche Abhängigkeit ihrer spezifischen Aktivität von der Enzymkonzentration auf. Verdünnt man Phosphofructokinase unter Konzentrationen von 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, so erhält man einen Abfall der spezifischen Aktivität (Abb. 1). Die Abhängigkeit der spezifischen Aktivität von der Enzymkonzentration zeigt einen sigmoiden Verlauf mit einem Wendepunkt bei 0,35 μg Phosphofructokinase pro ml bei pH 7,1. Wird dem Verdünnungsmedium 0,1M Phosphat zugesetzt, bleibt die optimale spezifische Aktivität bis zu einer Enzymkonzentration von 0,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ erhalten. Ein 50proz. Abfall der ursprünglichen spezifischen Aktivität tritt in Gegenwart von Phosphat

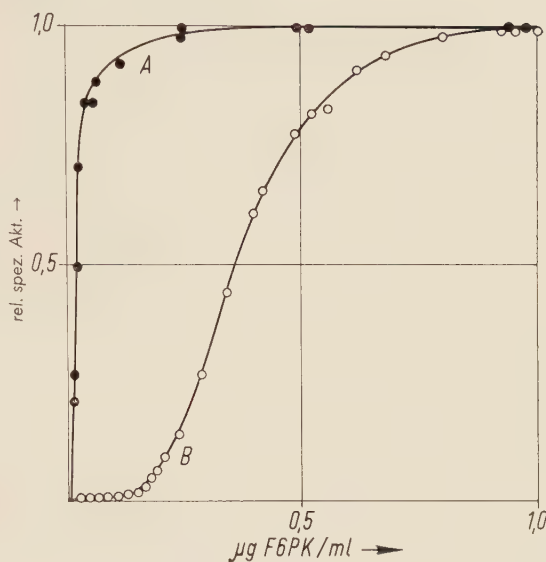


Abb. 1. Abhängigkeit der spezifischen Phosphofructokinase (F6PK)-Aktivität von der Enzymkonzentration. Das Enzym wurde in verschiedenen Verdünnungsansätzen 100 Min. lang inkubiert. Dann wurde die Aktivität der einzelnen Ansätze gemessen (Test B). Die optimale spezif. Aktivität wurde gleich 1,0 gesetzt. Die gemessenen Aktivitäten wurden auf die optimale spezif. Aktivität bezogen und als relative spezifische Aktivität (r) gegen die Enzymkonzentration im Ansatz aufgetragen. Bei Verdünnung in Phosphatpuffer und Glycyl-glycin-Puffer entsprach die relative spezif. Aktivität von 1,0 einer absoluten spezif. Aktivität von 132 U/mg Protein. Bei hohen Phosphofructokinase-Konzentrationen wurden die Konzentrationen der Hilfsenzyme gegenüber den in Test B angegebenen erhöht, so daß eine Limitierung der Umsatzrate durch das System der Hilfsreaktionen ausgeschlossen war.

Kurve A: Verdünnung der Phosphofructokinase (F6PK) in 0,1M Kaliumphosphat (pH 7,1).

Kurve B: Verdünnung der Phosphofructokinase (F6PK in 0,1M Glycyl-glycin (pH 7,1).

erst bei 0,018 $\mu\text{g}/\text{ml}$ auf, d. h. bei $1/20$ der Konzentration, bei der die gleiche Aktivitätsverminderung in Abwesenheit von Phosphat zu verzeichnen ist.

Abb. 2 zeigt eine logarithmische Auftragung des Verhältnisses von spezifischer Aktivität r zum Abfall der spezifischen Aktivität ($1 - r$) gegen den Logarithmus der jeweiligen Phosphofructokinase-Konzentration.

Die Analyse der resultierenden Geraden demonstriert die Abhängigkeit der spezifischen Aktivität

²⁸ P. D. BOYER, J. Amer. chem. Soc. 76, 4331 [1954].

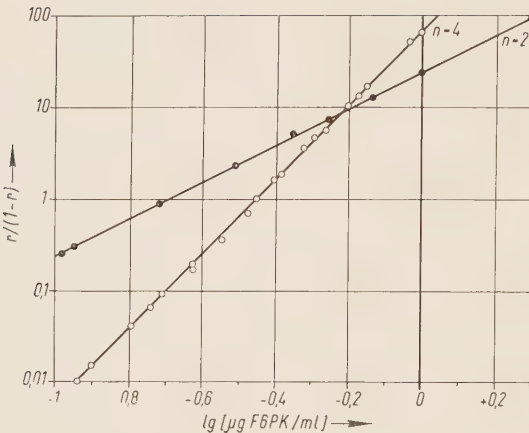


Abb. 2. Graphische Auswertung der Meßdaten von Abb. 1 nach Gleichung 1 (s. Text). Die Gerade mit der Steigung $n = 2$ entspricht der Kurve A in Abb. 1 und die Gerade mit der Steigung $n = 4$ der Kurve B.

von der Enzym-Konzentration ($[F6PK]$) nach der Funktion

$$\lg \frac{r}{1-r} = \lg k + n \cdot \lg [F6PK] \quad (1)$$

Da r der Konzentration an aktivem und $(1-r)$ der Konzentration an inaktivem Enzym proportional ist, läßt sich diese Gleichung auch als

$$\lg \frac{[F6PK_{\text{aktiv}}]}{[F6PK_{\text{inaktiv}}]} = \lg k' + n \cdot \lg [F6PK_{\text{gesamt}}] \quad (2)$$

oder als

$$\frac{[F6PK_{\text{aktiv}}]}{[F6PK_{\text{inaktiv}}]} = k' \cdot [F6PK_{\text{gesamt}}]^n \quad (3)$$

ausdrücken. Das Verhältnis aktiver zu inaktiver Phosphofructokinase ist somit der n ten Potenz der Gesamtzym-Konzentration proportional. n und die Proportionalitätskonstante k haben die Größen:

Verdünnung in	n	k
Glycyl-glycin 0,1M, pH 7,1	4	0,006
Phosphat 0,1M, pH 7,1	2	0,25.

Phosphat verringert die Neigung der aktiven Phosphofructokinase, in die inaktive Form überzugehen; gleichzeitig setzt es die Abhängigkeit der spezifischen Aktivität von der Enzymkonzentration herab.

Qualitativ ähnliche Wirkungen können auch bei Zusatz anderer Substanzen zum Verdünnungs-

medium festgestellt werden, die ebenso wie anorganisches Phosphat als „positive Effektoren“ bekannt sind (Fru-6-P, Fru-1.6-P₂, NH₄⁺ etc.).

2. Reaktivierung verdünnungsinaktivierter Phosphofructokinase

Der Vorgang der Inaktivierung durch Verdünnung läßt sich durch Erhöhung der Enzymkonzentration reversibel gestalten: 0,25 µg des Enzyms/ml ergeben eine spezifische Aktivität von 40,5 U/mg, was 17% der optimalen spezifischen Aktivität entspricht. Gibt man hierzu weitere 0,25 µg/ml, so mißt man 178 U/mg Protein, was einer relativen spezifischen Aktivität von 76% entspricht. Würde das Verhalten rein additiv sein, dürfte sich die spezifische Aktivität in diesem Versuch nicht ändern. Der tatsächlich eintretende Anstieg impliziert jedoch, gemäß Gleichung 1, die Reversibilität der Phosphofructokinase-Inaktivierung bei niedriger Enzymkonzentration.

3. Kinetik der Phosphofructokinase-Inaktivierung bei niedriger Enzymkonzentration

Die Inaktivierung durch Verminderung der Konzentration weist einen charakteristischen zeitlichen Verlauf auf (Abb. 3). Der Abfall der spezifischen Aktivität in den ersten Minuten ist um so rascher, je stärker die Verdünnung ist. In allen Fällen wird nach 50 Min. ein verdünnungsabhängiges Gleichgewicht mit der relativen spezifischen Aktivität r erreicht.

In Abb. 4 wurde die Differenz zwischen der jeweiligen spezifischen Aktivität zur Zeit t (bezeichnet als r_t) und der spezifischen Aktivität r im Gleichgewicht, d. h. $(r_t - r)$ gegen die seit dem Verdünnungsvorgang verstrichene Zeit t im doppelt logarithmischen Koordinatensystem aufgetragen. Die resultierende Gerade entspricht bei allen Verdünnungen der Funktionsgleichung

$$\lg t = \lg k - 2 \lg (r_t - r) \quad (4)$$

bzw.

$$t = \frac{k}{(r_t - r)^2} \quad (5)$$

Aus Abb. 4 ergibt sich für k der Zahlenwert 500. Die Ableitung von $(r_t - r)$ nach dt lautet folglich

$$\frac{d(r_t - r)}{dt} = -10^{-3} (r_t - r)^3. \quad (6)$$

Abb. 3. Zeitabhängige Abnahme der spezif. Aktivität unterschiedlicher Verdünnungsansätze der Phosphofructokinase in 0,05M Glycyl-glycin, pH 7,1.

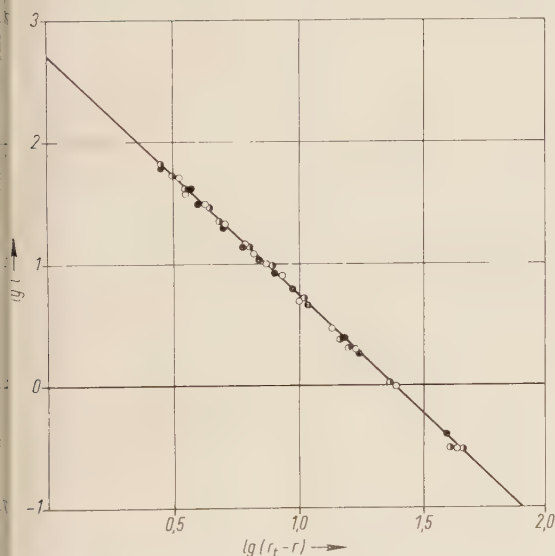
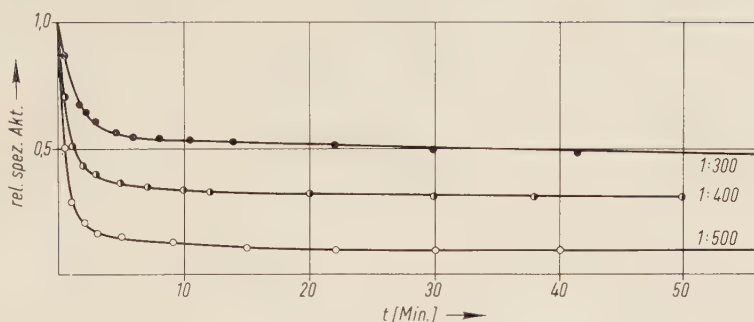


Abb. 4. Graphische Auswertung der Meßdaten von Abb. 3 nach Gleichung 4 (s. Text).

Betrachtet man r_t und r als proportional zur Konzentration der aktiven Form der Phosphofructokinase, so entspricht Gleichung 6 der Geschwindigkeitsgleichung einer Reaktion 3. Ordnung. Solange nicht bekannt ist, welche Reaktionsteilnehmer durch r_t bzw. r erfaßt werden und somit enzymatisch aktiv sind, läßt die aufgestellte Beziehung keine Rückschlüsse auf den Mechanismus der Inaktivierung zu. Insbesondere bleibt ungeklärt, inwieweit die Inaktivierung bevorzugt auf einer Dissoziation in Untereinheiten oder auf einer, möglicherweise auch zusätzlichen Veränderung der Tertiär- und Sekundärstruktur beruht. Die im folgenden aufgezeigte und zumindest partielle Reversibilität des Vorgangs spricht allerdings gegen eine

Denaturierung auf der Grundlage einer irreversiblen Umwandlung von Tertiär- und Sekundärstruktur. Auch die kinetische Analyse gibt keinen entsprechenden Hinweis. Selbstverständlich kann nicht ausgeschlossen werden, daß dem mit der kinetischen Analyse verfolgbaren Prozeß zwei Vorgänge zugrunde liegen:

1. eine reversible Dissoziation des Enzyms in Untereinheiten und
2. eine durch fehlende Stabilisierung der Untereinheiten bedingte Umwandlung der Tertiär- oder Sekundärstruktur.

4. pH-abhängige Inaktivierung der Phosphofructokinase

Die spezifische Aktivität hängt nicht nur von der Enzymkonzentration, sondern auch vom pH-Wert im Inkubationsmedium ab. Diese Abhängigkeit vom pH-Wert ist in Abb. 5 dargestellt. Bei einer konstanten Enzymkonzentration von 0,75 $\mu\text{g}/\text{ml}$

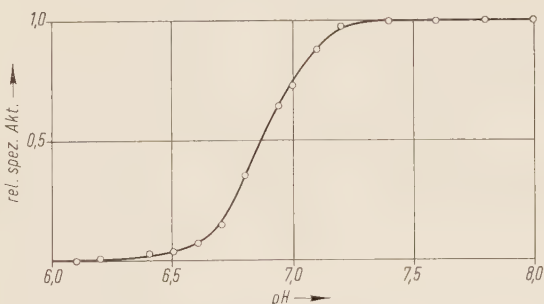


Abb. 5. Abhängigkeit der spezifischen Phosphofructokinase-Aktivität vom pH-Wert des Inkubationsmediums (0,05M Glycyl-glycin). Jeweils 0,75 μg Phosphofructokinase/ml wurden 60 Min. inkubiert. Anschließend wurde die Aktivität im Test B bestimmt und als relative spezifische Aktivität gegen den pH-Wert aufgetragen.

wurden die bei verschiedenen pH-Werten nach 60 Min. erreichten Gleichgewichtswerte der spezifischen Aktivitäten r bestimmt. Dabei findet sich, daß ein Absinken des pH-Wertes während der Inkubation unter pH 7,2 zu einem Abfall und schließlich totalen Verlust der spezifischen Aktivität führt. Die in Abb. 5 dargestellte sigmoide Kurve zeigt einen Wendepunkt bei pH 6,75 und halboptimaler spezifischer Aktivität.

Die Auftragung von $\lg \frac{r}{1-r}$ gegen $-\lg [H^{\oplus}]$ (Abb. 6) ergibt eine Gerade mit der Funktionsgleichung

$$\lg \frac{r}{1-r} = \lg k - 4 \lg [H^{\oplus}] \quad (7)$$

Der Terminus $\frac{r}{1-r}$ kann durch das Verhältnis von aktiver zu inaktiver Phosphofructokinase (F6PK) ersetzt werden, so daß Gleichung 7 auch als

$$\lg \frac{[F6PK_{\text{aktiv}}]}{[F6PK_{\text{inaktiv}}]} = \lg k' - 4 \lg [H^{\oplus}] \quad (8)$$

geschrieben werden kann. Delogarithmiert folgt daraus

$$\frac{[F6PK_{\text{aktiv}}] [H^{\oplus}]^4}{[F6PK_{\text{inaktiv}}]} = k \quad (9)$$

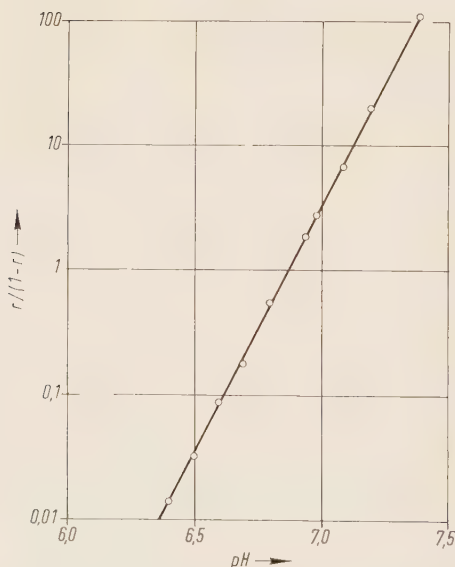


Abb. 6. Graphische Auswertung der Meßdaten von Abb. 5 nach Gleichung 7 (s. Text).

Die der pH-Inaktivierung zugrundeliegende Reaktion hat damit wahrscheinlich die Reaktionsgleichung



Bei der pH-abhängigen Überführung der aktiven in die inaktive Form werden folglich vier Protonen aufgenommen. Es bleibt vorerst unklar, welche basische Gruppe an der Reaktion beteiligt ist. Der pK-Wert von 6,75 legt die Vermutung nahe, daß es sich um die Imidazolgruppe von Histidin handelt. In gleicher Weise könnte der pK-Wert auch für die Reaktion einer proteingebundenen Phosphatgruppe (anorganisches Phosphat, Nucleosidphosphat) sprechen.

5. Kinetik der pH-abhängigen Inaktivierung der Phosphofructokinase

Ebenso wie die Verdünnungsinaktivierung ist die pH-Inaktivierung durch eine charakteristische Kinetik gekennzeichnet. Eine Analyse dieser in Abb. 7 aufgetragenen Kinetik führt zu einer Geraden (Abb. 8). Die Funktionsgleichung

$$\lg t = \lg 240 - 2 \lg (r_t - r), \quad (11)$$

ist der Gleichung 4 analog. Die Ableitung von $(r_t - r)$ nach dt

$$\frac{d(r_t - r)}{dt} = -2,08 \cdot 10^{-3} \cdot (r_t - r)^3 \quad (12)$$

entspricht derjenigen der Verdünnungsinaktivierung (Gleichung 6) mit Ausnahme der Geschwindigkeitskonstanten, die hier doppelt so groß ist. Hier wie dort weist die Geschwindigkeitsgleichung auf eine Reaktion 3. Ordnung hin.

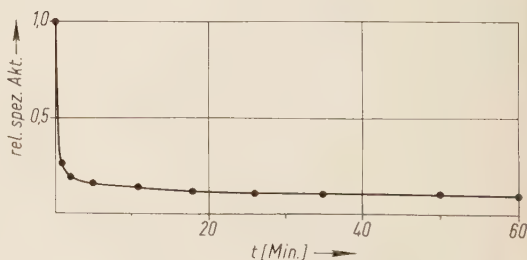


Abb. 7. Zeitabhängigkeit der Phosphofructokinase-Inaktivierung in 0,05M Glycyl-glycin, pH 6,7. Phosphofructokinase-Konzentration im Ansatz: 0,75 $\mu\text{g/ml}$. Die im Test B bestimmten Aktivitäten wurden als relative Aktivität gegen die Zeit aufgetragen.

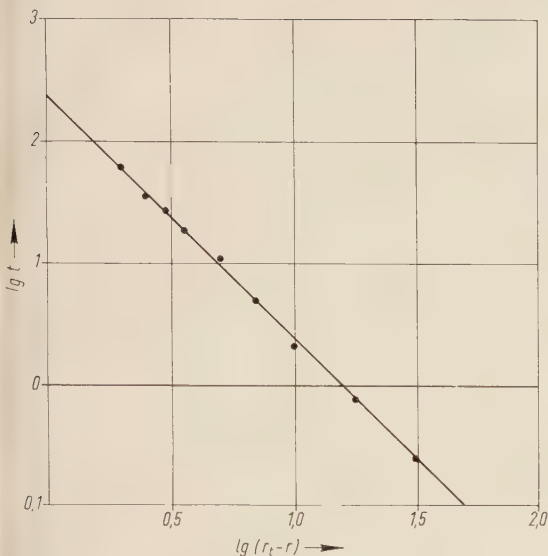


Abb. 8. Graphische Auswertung der Inaktivierungskinetik von Abb. 7 nach Gleichung 11 (s. Text).

Die auffällige Übereinstimmung in der Kinetik beider Prozesse legt nahe, daß es sich um identische Reaktionen handelt. Die Geschwindigkeit und die Gleichgewichtseinstellung der Inaktivierung würde danach sowohl von der Protonenkonzentration als auch von der Enzymkonzentration abhängen.

6. Reaktivierung inaktiver Phosphofructokinase durch Phosphationen

Reversibilität wird auch im Falle der pH-Inaktivierung beobachtet. Die Zeitabhängigkeit einer solchen Reaktivierung ist in Abb. 9 dargestellt. Phosphofructokinase wurde bei pH 6,4 inaktiviert und dann in einer Konzentration von 0,75 $\mu\text{g/ml}$ in einem Phosphatmedium (0,1M) von pH 7,7 inkubiert. Die in verschiedenen Zeitabständen bestimmte spezifische Aktivität wurde gegen die Zeit aufgetragen. Aus dem Verlauf der Kurve folgt, daß eine Reaktivierung nach 200 Min. erst zu 25% eingetreten ist. Die Kinetik dieser Reaktivierung ist komplex und nicht mit der Kinetik der Inaktivierung zu vergleichen.

Die kinetische Analyse allein läßt hier keine Entscheidung zu, ob es sich bei der Inaktivierung und Reaktivierung um gleiche Prozesse handelt, die sich nur in ihrer Verlaufsrichtung unterscheiden. Es kann tatsächlich nicht ausgeschlossen werden, daß es sich um unterschiedliche Reaktionstypen handelt. Ebenso wenig kann

entschieden werden, ob das Endprodukt der Reaktivierung dem Ausgangsprodukt der Inaktivierung entspricht. Die Tatsache, daß die Reaktivierung nur zu 25% erfolgt, kann nämlich ebenso Ausdruck unterschiedlicher Formen von aktiver Phosphofructokinase wie unvollkommener Reaktivierung des Enzyms sein.

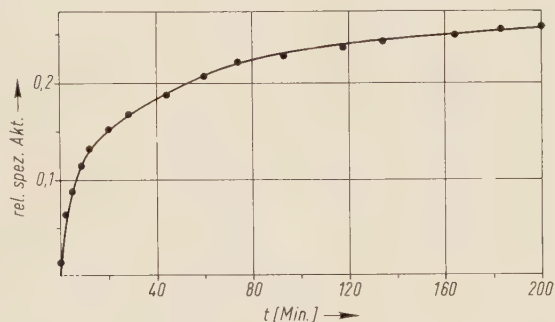


Abb. 9. Zeitabhängigkeit der Reaktivierung von Phosphofructokinase in Phosphatpuffer, pH 7,7. 1,5 μg Phosphofructokinase/ml wurden durch 100min. Inkubation in 0,05M Glycyl-glycin, pH 6,4, inaktiviert. Anschließend wurde der Versuchsansatz durch Zugabe von 0,2M K_2HPO_4 1:2 verdünnt. In fortlaufenden Bestimmungen wurde die Aktivität im Test B gemessen. Im Reaktivierungsansatz betrug demnach die Konzentration des Enzyms 0,75 $\mu\text{g/ml}$ und die Phosphatkonzentration 0,1 Mol/l.

7. Reaktivierung inaktiver Phosphofructokinase durch ihre Substrate

Die Reaktivierung nach Inaktivierung in saurem Medium erfolgt nicht nur bei Inkubation mit Phosphat. In Gegenwart der Substrate Fru-6-P und ATP, bei Anwesenheit von Mg^{2+} , findet man eine andere Form der Reaktivierung. Ihre Kinetik ist in Abb. 10 dargestellt. Der Anstieg der spezifischen Aktivität ist rascher und weitreichender als bei Inkubation inaktiver Phosphofructokinase in phosphathaltigem Medium. Wie Abb. 11 zeigt, bestehen Unterschiede auch im Reaktionstyp: In der Darstellung wurden die n ten Potenzen der spezifischen Aktivitäten gegen die Reaktivierungszeit aufgetragen. Es resultiert eine Gerade, deren Funktionsgleichung

$$r^n = k \cdot t \quad (13)$$

die Vorgänge, welche sich bei phosphat- bzw. substratbedingter Reaktivierung abspielen, quantitativ zusammenfaßt. Die Zahl n hat bei Reaktivierung im Phosphatmedium den Wert 4; bei Reaktivierung

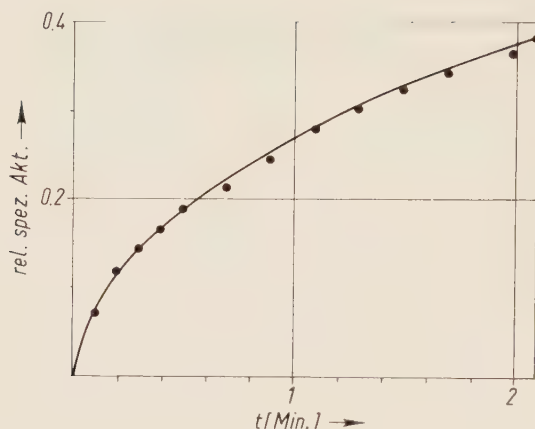


Abb. 10. Reaktivierung inaktiver Phosphofructokinase in Gegenwart ihrer Substrate. Fru-6-P 2,0mM; ATP 2,0mM; Mg^{2+} 4,0mM; pH 7,6. Die Inaktivierung erfolgte analog zum Experiment in Abb. 9 durch 100min. Inkubation des Enzyms in 0,05M Glycyl-glycin vom pH-Wert 6,4.

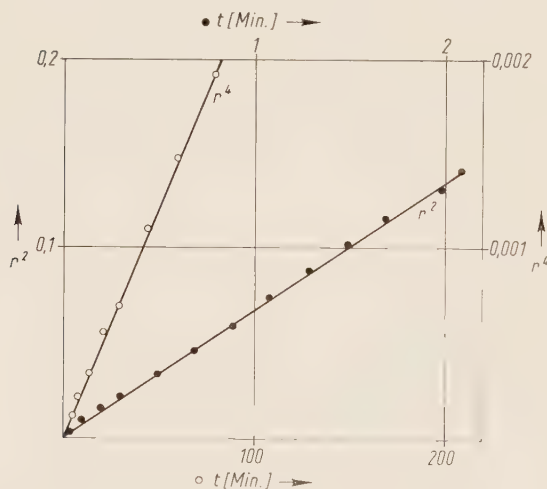


Abb. 11. Graphische Auswertung der Daten von Abb. 9 und Abb. 10 nach Gleichung 13 (s. Text).

○—○, untere Abszisse und rechte Ordinate: nach Daten der Abb. 9 bei Auftragung für $n = 4$.

●—●, obere Abszisse und linke Ordinate: nach Daten der Abb. 10 bei Auftragung für $n = 2$.

in Gegenwart der Substrate ist der Zahlenwert von n gleich 2. Dieser Befund kann auf verschiedene Weise gedeutet werden. Er legt aber die Vermutung nahe, daß die Reaktivierung der inaktiven Form nach unterschiedlichen Reaktionsmechanismen vollzogen werden kann, wobei möglicherweise auch die Produkte der Reaktivierung unterschiedlich sind.

8. Inaktivierung von Phosphofructokinase durch Harnstoff

Bei Einwirkung von Harnstoff zeigt sich ein weiterer Typ der Inaktivierung, der möglicherweise auch hinsichtlich des zugrundeliegenden Mechanismus aufschlußreich ist. 12stdg. Inkubation des Enzyms in einem Medium, das 2M Harnstoff, 0,1M Phosphat und 0,5M Ammoniumsulfat, pH 7,6, enthält, führt zu vollständiger Inaktivierung. In Gegenwart von Ammoniumsulfat und Phosphat allein wird unter gleichen Bedingungen kein Aktivitätsverlust beobachtet. Bei der analytischen Chromatographie auf Sepharose 4 B* (Fa. Pharmacia) zeigt das mit Harnstoff behandelte Enzym gegenüber der Kontrolle ein Verhalten, welches auf eine Verkleinerung des Moleküls hinweist. Systematische Studien zum Sedimentationsverhalten der Phosphofructokinase im linearen Saccharosegradienten²⁹ ergaben unter Einwirkung von 2M Harnstoff eine Halbierung des Molekulargewichts von 350000 auf 180000.

9. Inaktivierung der Phosphofructokinase mit *p*-Chlormercuri-benzoat

Durch spektrophotometrische Titration mit *p*-Chlormercuri-benzoat nach²⁸ lassen sich pro 93500 g des Enzyms zwei Mol Sulfhydrylgruppen bestimmen (vgl. Abb. 12).

Setzt man im titrimetrischen Phosphofructokinase-Test dem Testansatz *p*-Chlormercuri-benzoat zu, so sinkt die Aktivität proportional zu dessen Konzentration (vgl. Abb. 13). Wird dabei eine Sulfhydrylgruppe pro Enzym-Untereinheit vom Molekulargewicht 93500 blockiert, so erlischt die enzymatische Aktivität völlig. Durch Zusatz eines großen Überschusses an Cystein läßt sie sich wieder vollständig regenerieren.

Diskussion

Ausführliche Untersuchungen zur Inaktivierung und Reaktivierung der Phosphofructokinase wurden vor allem von MANSOUR⁵ publiziert.

* Chromatographie in Sepharose 4 B: 150 cm lange Säule vom Durchmesser 1 cm. Die Elution erfolgte bei einem Durchfluß von 6 ml/Std. mit einer Lösung folgender Zusammensetzung: 0,1M Kaliumphosphat, 1,0M $(NH_4)_2SO_4$ (zur Stabilisierung), 2,0M Harnstoff, 0,01M EDTA, pH 7,0. Vor der Auftragung auf die Säule wurde das Enzym 4 Std. lang gegen ein zweimal gewechseltes 10000faches Volumen der Elutionslösung dialysiert.

²⁹ J. NOLTE u. D. PETTE, in Vorbereitung.

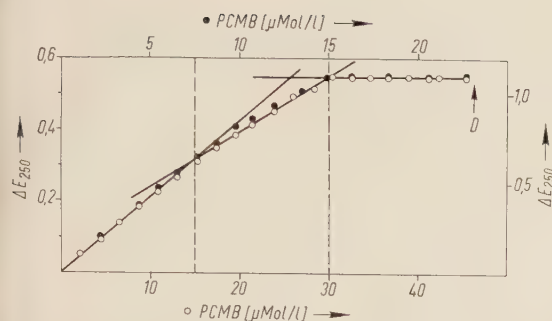


Abb. 12. Spektrophotometrische Titration von 0,68 (○, untere Abszisse und rechte Ordinate) und 1,36 mg (●, obere Abszisse und linke Ordinate) Phosphofructokinase mit *p*-Chlormercuri-benzoat (PCMB) bei 250 m μ und 39°C. Die durch die PCMB-Zugabe entstehende Extinktionsänderung ΔE wurde gegen die Konzentration des PCMB aufgetragen. Die so erhaltene Titrationskurve läßt sich in zwei Abschnitte zerlegen, innerhalb derer die Extinktionsänderung der Konzentration des PCMB proportional ist. Die gestrichelten Linien markieren die den Abschnittsgrenzen zugehörigen PCMB-Konzentrationen. Die Grenze des ersten Abschnitts liegt bei $7,5 \cdot 10^{-6}\text{M}$ PCMB für 0,68 mg Phosphofructokinase/ml und bei $14,55 \cdot 10^{-6}\text{M}$ PCMB für 1,36 mg Phosphofructokinase/ml. Daraus läßt sich 1 Mol SH-Gruppen pro 93 500 g Enzym in diesem Stadium der Titration errechnen. Die Grenze des zweiten Abschnitts liegt für 0,68 mg Enzym/ml bei $14,55 \cdot 10^{-6}\text{M}$ PCMB und für 1,36 mg Enzym/ml bei $29,2 \cdot 10^{-6}\text{M}$ PCMB. Dies entspricht der Titration von 1 Mol SH-Gruppen pro 46 750 g Phosphofructokinase bzw. der Titration von 2 Molen SH-Gruppen pro 93 500 g. Eine darüber hinausgehende Zugabe von PCMB führt zu keiner weiteren Extinktionsänderung. PCMB, das bei 0,68 mg Enzym/ml die Konzentration von $22,3 \cdot 10^{-6}\text{M}$ und bei 1,36 mg Enzym/ml die Konzentration von $44,6 \cdot 10^{-6}\text{M}$ überschreitet, führt zu einer raschen Denaturierung (Punkt D der Abbildung).

Im Vordergrund stand dabei die Inaktivierung bei niedrigen pH-Werten und die Reaktivierung des Enzyms im Alkalischen, die durch Zusatz der Substrate und verschiedener Adenosinnucleotide verstärkt wurde. Dabei wurde gezeigt, daß mit der Inaktivierung des Enzyms eine Verringerung des Molekulargewichts einhergeht. Eine konzentrationsabhängige Verringerung des Molekulargewichts bei Verdünnung des Enzyms wurde von LING, MARCUS und LARDY¹² und von PARMEGGIANI, LUFT, LOVE und KREBS²¹ beschrieben. PAETKAU und LARDY¹⁴ bestimmten für die kleinste noch aktive Einheit der Phosphofructokinase ein Molekulargewicht von 380 000. Ein Verlust der enzy-

matischen Aktivität wurde durch Verdünnung bei pH 6,7, durch Behandlung mit Harnstoff bei pH 5,8 und durch Ansäuern auf pH 5,0 erzielt. Jeder dieser Inaktivierungen entsprach eine Verkleinerung des Molekulargewichtes auf 192 000. Aus den Untersuchungen der zitierten Autoren und auch aus den Daten von UYEDA und RACKER^{25,26} folgt die reversible Assoziation und Dissoziation der Phosphofructokinase.

Die in der vorliegenden Arbeit mitgeteilten Befunde dienen der quantitativen und kinetischen Analyse der reversiblen Assoziation und Dissoziation und der damit verbundenen Einflüsse auf die Enzymaktivität. Im Vordergrund steht der Befund, daß die quantitative Analyse sowohl für die konzentrationsabhängige Inaktivierung als auch für die pH-abhängige Inaktivierung den gleichen Reaktionstyp aufzeigt. Die Identität der Reaktionstypen läßt sich aus der Gleichheit der Kinetik der Reaktionen ableiten.

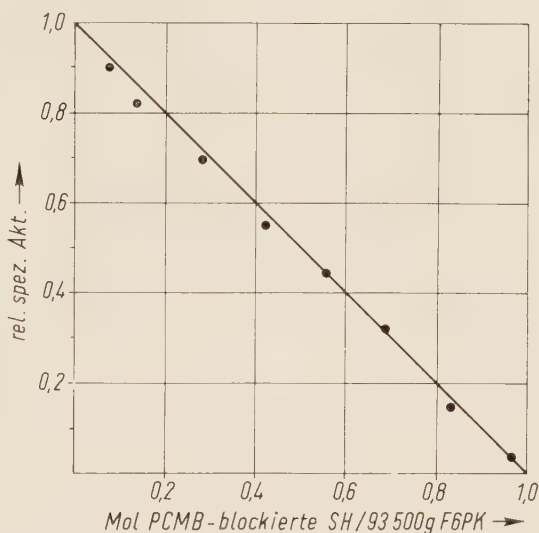


Abb. 13. Verhalten der katalytischen Aktivität von Phosphofructokinase bei Zusatz von *p*-Chlormercuri-benzoat (PCMB) im titrimetrischen Test (Test C). Um die Abnahme der Enzymaktivität bei PCMB-Zusatz deutlich zu machen, erfolgte eine Auftragung der relativen spezifischen Aktivität der Phosphofructokinase gegen die Zahl der Mole SH-Gruppen in Phosphofructokinase pro 93 500 g Phosphofructokinase, deren Blockade durch Zusatz einer entsprechenden Konzentration von *p*-Chlormercuri-benzoat zum Testsystem C erzielt wurde. Bei 1 Mol blockierter SH-Gruppen pro 93 500 g Enzym ist der Verlust an Enzymaktivität vollständig.

Die kinetische Analyse allein gibt allerdings keine Auskunft über die Zahl der bei der Verdünnungs- und pH-Inaktivierung gebildeten Untereinheiten. Diesbezügliche Einblicke gestatten jedoch die Daten der oben zitierten Sedimentationsanalysen¹⁴: Saurer Milieu und hohe Verdünnung bedingen eine Halbierung des Molekulargewichtes.

Damit ist klagestellt, daß nicht nur die Inaktivierung durch Harnstoff, sondern auch die pH- und verdünnungsabhängige Inaktivierung auf einer Dissoziation des Enzym-Moleküls in eine inaktive Untereinheit mit einem Molekulargewicht von ca. 180000 beruht. Dadurch wird der aus der kinetischen Analyse des Inaktivierungsprozesses gezogene Schluß, daß es sich bei den verschiedenen Typen der Inaktivierung um ein und denselben Vorgang handelt, bestätigt.

Im Hinblick auf die Tatsache, daß bei der Inaktivierung der Phosphofructokinase 4 Protonen aufgenommen werden, liegt die Annahme nahe, daß die Dissoziation entweder in 4 oder 2 Untereinheiten erfolgt, vorausgesetzt, daß es sich um symmetrische Untereinheiten handelt. Durch die Sedimentationsanalyse ist allerdings eine Dissoziation des Enzyms in zwei Untereinheiten klagestellt. Jede Untereinheit nimmt dabei wahrscheinlich zwei Protonen auf. Daß es sich bei der Komponente mit dem Molekulargewicht 180000 noch nicht um die kleinste identische Untereinheit handelt, folgt aus den Befunden von PAETKAU und LARDY¹⁴, die durch Behandeln des Enzyms mit Dodecylsulfat eine Dissoziation in Untereinheiten mit dem Molekulargewicht 95000 erzielten.

Die Inaktivierung durch das SH-Gruppen-Reagenz *p*-Chlormercuri-benzoat beruht wahrscheinlich auf einem grundsätzlich anderen Mechanismus als die Inaktivierung des Enzyms durch Konzentrationsverminderung, sauren pH-Wert und Harnstoffbehandlung. *p*-Chlormercuri-benzoat beeinflusst die drei letztgenannten Vorgänge nicht. Deshalb ist es unwahrscheinlich, daß SH-Gruppen bei den Dissoziations- und Assoziationsvorgängen eine Rolle spielen, welche als Ursache der Verdünnungs-, pH-

und Harnstoff-abhängigen Inaktivierung anzusehen sind. Möglicherweise greifen die SH-Gruppen unmittelbar in den Katalysevorgang ein.

Bereits PAETKAU und LARDY¹⁴ haben nachgewiesen, daß die Enzymaktivität dem Reduktionsgrad der Sulfhydrylgruppen der Phosphofructokinase proportional ist. Bemerkenswert ist unser Befund, daß sich aus der SH-Gruppen-Titration eine Untereinheit mit dem Molekulargewicht von 93500 ableiten läßt. Dieser Wert stimmt bestens mit der durch direkte Molekulargewichtsbestimmung von PAETKAU und LARDY ermittelten Untereinheit 95000 überein. Weiterhin folgt, daß diese Untereinheit mindestens 2 SH-Gruppen besitzt. Das aktive Enzym mit dem vierfachen Molekulargewicht enthält somit acht SH-Gruppen, die für die katalytische Aktivität essentiell sind.

Mit dem reversiblen Übergang von der aktiven in die inaktive Form durch Dissoziation, oder aber durch Blockierung von Sulfhydrylgruppen, sind Möglichkeiten für eine Beeinflussung der Enzymaktivität *in vitro* aufgezeigt. Eine Übertragung der Ergebnisse auf die Verhältnisse *in vivo* ist im Hinblick auf die zugrunde liegenden Mechanismen der hier betrachteten Inaktivierungs- bzw. Reaktivierungsprozesse wohl kaum möglich. Eine einzige Ausnahme ist vielleicht die pH-abhängige Dissoziation und Inaktivierung. Inwieweit allerdings eine Steuerung der Enzymaktivität *in vivo* auf der Grundlage dieses Mechanismus erfolgt, ist unklar, weil einerseits exakte Daten über den pH-Wert und seine Variation am intrazellulären Wirkort des Enzyms nicht vorliegen und andererseits die Steuerung der Enzymaktivität durch Dissoziation in inaktive Untereinheiten und Assoziation der Untereinheiten zum aktiven Enzym nur eine von vielen anderen Möglichkeiten der Regulierung darstellt. Hierzu zählen vor allem mannigfaltige Einflüsse von Substratkonzentrationen, positiven und negativen Effektoren auf die kinetischen Eigenschaften der Phosphofructokinase, über die in einer folgenden Mitteilung berichtet werden soll³⁰.

³⁰ H. W. HOFER u. D. PETTE, im Druck.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Pette für die vielfältige Unterstützung, die er mir in den drei Jahren, die ich in seinem Arbeitskreis tätig war, zuteil werden ließ. Mit unzähligen Anregungen und Diskussionen förderte er auch den Fortgang meiner Arbeit.

Herrn Professor Dr. Dr. Bücher bin ich für die mir gebotene Gelegenheit, am physiologisch-chemischen Institut zu arbeiten, zu Dank verpflichtet.

Frau Gertraud Lusch danke ich herzlich für die sorgfältige Anfertigung der Abbildungen.

LEBENS LAUF

Ich wurde am 5. August 1941 in München geboren. Meine Eltern sind der Postbeamte Johann Hofer und seine Frau Johanna, geb. Kühnel. 1960 legte ich das Abitur am Luitpold - Gymnasium in München ab. Anschließend studierte ich an der Universität München Medizin. Physikum 1963, Staatsexamen 1966.

Im Arbeitskreis von Herrn Professor Dr. Pette bin ich seit Juli 1964 tätig.

